



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE UNA NUEVA ISOFORMA DE LA
PROTEÍNA TRANSFERIDORA DE ÉSTERES DE COLESTEROL (CETP)**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Doctor en Ciencias**

**PRESENTA:
VICTOR GUADALUPE GARCÍA GONZÁLEZ**

**TUTOR PRINCIPAL
JAIME MAS OLIVA (IFC, UNAM)**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
JESÚS ADOLFO GARCÍA SÁINZ (IFC, UNAM)
EDGAR VAZQUEZ CONTRERAS (UAM-C)**

MÉXICO, D. F. Agosto, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 322N del departamento de Bioquímica y Biología Estructural del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Jaime Mas Oliva

Dedicatoria

La presente tesis esta dedicada a mi madre Maria Inés González Reyes

Abreviaturas

AMP	Péptidos antimicrobianos
ANM	Academia Nacional de Medicina
AP	Fosfatasa alcalina
AuNPs	Nanopartículas de oro
BPI	Proteína bactericida/incrementadora de permeabilidad
BSA	Albúmina sérica bovina
CETP	Proteína transferidora de ésteres de colesterol
CETPI	Isoforma I de la proteína transferidora de ésteres de colesterol
CG	Coarse grained o grano grueso
cmc	Concentración micelar crítica
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios
DC	Dicroísmo circular
DE	Desviación estándar
DO	Densidad óptica
DPPC	Dipalmitoil fosfatidilcolina
DLS	Dispersión dinámica de luz
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ERO	Especies reactivas de oxígeno
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
IMPI	Instituto Mexicano de la Propiedad Intelectual
LCAT	Lecitin colesterol acil transferasa
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LPA	Ácido lisofosfatídico
LPS	Lipopolisacáridos
Lyso-C ₁₂ PC	12-lisofosfatidilcolina
μH	Momento hidrofóbico
MET	Microscopía electrónica de transmisión
MTT	3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide
PA	Ácido fosfatídico
PC	Fosfatidilcolina
PDB	Protein Data Bank
PE	Fosfatidiletanolamina
PmB	Polimixina B
POPC	1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina
POPG	1-palmitoil-2-oleoil- fosfatidilglicerol
SFB	Suero fetal bovino
STRAP	Interactive Structure based Sequences Alignment Program
ThT	Tioflavina T
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
TLR-4	Receptor tipo Toll-4

VLDL Lipoproteínas de muy baja densidad
WB Western-blot (Inmunodetección)

Contenido	Página
1. Resumen.....	1
2. Abstract.....	3
3. Introducción.....	5
4. Arreglos estructurales clave en el dominio C-terminal de CETP sugieren un mecanismo potencial para la actividad de transferencia de lípidos.....	13
4.1 Resumen.....	13
4.2 Introducción.....	14
4.3 Materiales y métodos.....	16
4.4 Resultados y discusión.....	21
4.5 Referencias.....	35
5. Formación de fibras amiloides en péptidos derivados del C-terminal de CETP modulada por lípidos.....	39
5.1 Resumen.....	39
5.2 Introducción.....	40
5.3 Materiales y métodos.....	42
5.4 Resultados y discusión.....	45
5.5 Referencias.....	54

6. La función de unión a lipopolisacáridos está determinada por el dominio C-terminal de CETPI.....	56
6.1 Resumen.....	56
6.2 Introducción.....	57
6.3 Materiales y métodos.....	60
6.4 Resultados y discusión.....	69
6.5 Referencias.....	95
7. Conclusiones.....	99
8. Perspectivas.....	101
Anexos.....	103
I. Publicación: Key structural arrangements at the C-terminus domain of CETP suggest a potential mechanism for lipid-transfer activity. García-González V, Gutiérrez-Quintanar N, Mendoza-Espinosa P, Brocos P, Piñeiro A, Mas-Oliva J (2014). <i>J Struct Biol.</i> 186, 19-27.....	104
II. Solicitud de patente: Vacuna de aplicación nasal contra el desarrollo de la enfermedad aterosclerótica y el hígado graso.....	105
III. Reconocimiento: La patente “Vacuna de aplicación nasal contra el desarrollo de la enfermedad aterosclerótica y el hígado graso”, recibió un reconocimiento dentro del programa de fomento al patentamiento y la innovación de la UNAM (2012-2013).....	110
IV. Libro publicado: “El concepto de enfermedad asociado a la conformación de proteínas”.....	112

V. Premio: <i>Textos Médicos 2010</i> que otorga la Academia Nacional de Medicina por “El concepto de enfermedad asociado a la conformación de proteínas”	116
VI. Publicación: Amyloid fibril formation of peptides derived from the C-terminus of CETP modulated by lipids. García-González V, Mas-Oliva J (2013). <i>Biochem Biophys Res Commun.</i> 434, 54-59.....	117
VII. Capítulo en libro conmemorativo de la ANM: “Nuevos Péptidos y Proteínas con la Capacidad de Unión a Lipopolisacáridos como Potenciales Agentes Terapéuticos contra el Choque Séptico”	118
VIII. Publicación: Lipopolysaccharide-binding function determined by the C-terminus domain of CETPI. García-González V, Gutiérrez-Quintanar N, Mas-Oliva J (2014). (En revisión).....	121
IX. Solicitud de patente: Péptidos derivados del dominio C-terminal de CETPI como moléculas bloqueadoras del efecto citotóxico inducido por lipopolisacáridos en septicemia y choque séptico.....	122
X. Coautoría en publicación: Microenvironmentally controlled secondary structure motifs of apolipoprotein A-I derived peptides. Mendoza-Espinosa P, Montalvan-Sorrosa D, García-González V, Moreno A, Rolando C, Mas-Oliva J (2014). <i>Mol Cell Biochem.</i> 393, 99-109.....	125

1. Resumen

La proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP) promueve la transferencia de lípidos neutros entre lipoproteínas en el plasma, en este sentido se ha demostrado que el sitio crítico para la función está determinado a los últimos 12 residuos del dominio C-terminal, estructurado en α -hélice. A través de la evaluación de la estabilidad estructural de péptidos derivados del C-terminal en un amplio rango de pH y mezclas de lípidos, se estudió su capacidad de llevar a cabo transiciones estructurales desorden-orden dependientes de lípidos. Mientras una mezcla de fosfatidilcolina/ésteres de colesterol forma partículas agregadas, el tratamiento con los péptidos en una estructura α -hélice, permite la formación de estructuras homogéneas de tipo micelar con una reducción en el tamaño de las partículas. El ordenamiento de lípidos se encontró asociado con transiciones en la estructura secundaria del C-terminal cuando se evaluaron lípidos como el ácido lisofosfatídico (LPA) o la lisofosfatidilcolina. Cuando la proteína CETP completa fue estudiada, el mismo fenómeno se lleva a cabo. De tal forma que la propiedad de ordenamiento de lípidos a través de transiciones desorden-orden en el C-terminal podría estar asociada con un posible movimiento de lípidos a través de una interface acuosa mediada por CETP.

Utilizando como modelo al péptido hélice-Z con la mutación D₄₇₀N en el C-terminal de CETP, hemos reportado cambios conformacionales en un microambiente libre de lípidos. Estas condiciones originan la formación de un núcleo hidrofóbico que favorece la presencia de una estructura secundaria- β , y la consecuente formación de oligómeros y fibras de tipo amiloide. En este caso, se evaluó el papel de varios arreglos de lípidos como moduladores de la estructura secundaria. Se demostró que el tratamiento de la hélice-Z con LPA y lisofosfatidilcolina promueve el cambio estructural de una cadena- β hacia la α -hélice nativa. Incluso, la incubación de la hélice-Z bajo concentraciones de LPA mayores a 2.5 mM inhibió la formación de fibras amiloides, de manera que las interacciones del péptido sobre la interface hidrofílica/hidrofóbica, deben retener a los monómeros de péptido en la superficie y

prevenir el auto ensamblaje. Los resultados sugieren que la modulación de la estructura secundaria requiere de condiciones específicas asociadas con el microambiente de lípidos, como el grado de solvatación y el tamaño de la cabeza polar lipídica.

Considerando que cambios estructurales en el C-terminal de CETP pueden modificar la función, en nuestro grupo se describió una nueva isoforma de CETP expresada en el intestino delgado, sin haberse caracterizado su función. A diferencia de CETP, la isoforma CETPI no tiene los últimos 24 residuos del C-terminal, y en su lugar una secuencia de 18 residuos con un alto contenido en prolinas y residuos con carga positiva están presentes, condiciones que hemos demostrado promueven una estructura secundaria desordenada que no es modulada por lípidos. La expresión de CETPI en cultivos celulares de intestino delgado responde a un estímulo con lipopolisacáridos (LPS). En este contexto, usando péptidos derivados del nuevo C-terminal se encontró una función relacionada con la unión a LPS, condición que está determinada por interacciones electrostáticas abarcando varios serotipos de LPS. Incluso, el tratamiento con un péptido correspondiente a los últimos 18 residuos protege de la citotoxicidad inducida por los LPS en macrófagos, y empleando un modelo de choque séptico en conejos, el tratamiento con el C-terminal favorece condiciones de protección.

En conclusión, el estudio sobre las proteínas CETP y CETPI ha permitido definir que cambios de estructura secundaria en dominios específicos de las proteínas pueden ser claves para la función. Bajo nuestras condiciones experimentales, la caracterización de CETP y CETPI, cuya única diferencia radica en el dominio C-terminal, ha permitido identificar cambios locales a nivel de estructura secundaria sobre estos dominios, que pueden conducir a la definición funcional de las proteínas.

2. Abstract

Cholesteryl-ester transfer protein (CETP) promotes the transfer of neutral lipids between lipoproteins in plasma. It has been demonstrated that the critical site for the function is determined by the last 12 residues of the C-terminus, which are structured as an α -helix. The evaluation of structure stability of peptides derived from the C-terminus in a wide range of pH and lipid mixtures allowed us to determine, their ability to carry out lipid dependent disorder-to-order secondary structure transitions. A mixture of phosphatidylcholine/cholesteryl-esters forms aggregated particles, but when treated with peptides in a α -helix structure, the mixture forms small homogeneous micelle-like structures with a reduction in particle size. The lipid ordering was directly connected to secondary structural transitions at the C-terminus domain when lysophosphatidic acid (LPA) and lysophosphatidylcholine were evaluated. When purified CETP was studied, the same phenomenon took place. Therefore, the property of lipid ordering through disorder-to-order transition at the C-terminus may be associated with a possible movement of lipids across aqueous interface mediated by CETP.

Employing peptide helix-Z with the D₄₇₀N mutation in the C-terminus of CETP, we have reported conformational changes in a non-lipid microenvironment. These conditions give origin to a hydrophobic cluster which favors the presence of a β -secondary structure, a mechanism coupled with the formation of oligomers and amyloid-like fibrils. In this case, the role of several lipid arrangements as potential modulators of secondary structure was evaluated. We demonstrated that treatment with LPA and lysophosphatidylcholine in helix-Z promotes a structural change from a β -chain to an α -helix. Even more, incubation of helix-Z with LPA concentrations above 2.5 mM inhibited the formation of amyloid fibrils, therefore interactions of peptide with specific hydrophilic/hydrophobic interfaces, should retain peptide monomers at the surface and prevent peptide self-assembly. Results suggest that modulation of the secondary structure requires specific conditions associated with lipid

microenvironment, such as the degree of solvation and the size of the polar head of lipids.

Considering that structural changes in the C-terminus of CETP can modify its function, our group identified a new isoform of CETP expressed in the small intestine, whose function has not been characterized. Unlike CETP, the CETPI isoform lacks the last 24 C-terminal residues, instead a sequence of 18 residues with a high content of proline and positively charged residues is present, conditions that promote a disordered secondary structure that is not modulated by lipids. CETPI expression in small intestine cell cultures responds to a lipopolysaccharide (LPS) stimuli. In this sense, employing peptides derived from the new C-terminus we found a function associated to LPS binding, condition determined by electrostatic interactions comprising several LPS serotypes. Even more, the treatment with a peptide corresponding to the last 18 residues protects against cytotoxicity effects induced by LPS on macrophages, and using a rabbit septic shock model, the treatment with the C-terminus favors protective conditions.

In conclusion, the study of proteins CETP and CETPI has allowed to define that secondary structure changes in specific domains of proteins may be a key factor for the function. Under our experimental conditions, the characterization of CETP and CETPI, which differ only in the C-terminus domain, has identified local changes at the level of secondary structure of these domains, which may lead to the functional definition of proteins.

3. Introducción

CETP es una glicoproteína hidrofóbica que lleva a cabo la transferencia de ésteres de colesterol y triglicéridos entre lipoproteínas, principalmente direccionando el flujo de colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) hacia lipoproteínas de baja y muy baja densidad (LDL y VLDL, respectivamente). Asimismo, se ha descrito que CETP tiene la capacidad de transferir triglicéridos de las VLDL hacia HDL, lo que en su conjunto origina un cambio en la composición, tamaño y estructura esférica de las HDL [1]. Por lo tanto, varios estudios sobre polimorfismos y deficiencias genéticas en CETP sugieren una relación directa entre su actividad, los niveles de colesterol en HDL y el potencial desarrollo de la enfermedad cardiovascular [2]. Estudios de delección y mutagénesis sitio específica han mostrado que el dominio localizado en el C-terminal (E₄₆₅-S₄₇₆), estructurado como una α -hélice anfipática, corresponde con una región clave para la transferencia de lípidos [3-5].

CETP es una proteína plasmática de 476 residuos, contiene cuatro glicosilaciones y un 44 % de los residuos son hidrofóbicos. La estructura cristalográfica de CETP refleja una estructura alargada en forma de *boomerang* con un plegamiento homólogo a la proteína bactericida/incrementadora de permeabilidad (BPI) [6,7]. La descripción estructural de CETP se puede realizar en cuatro dominios: un barril- β en cada costado de la proteína nombrados barriles N y C, una hoja β central conectora entre los dos barriles y una extensión C-terminal denominada hélice-X (Figura 1), la cual no se encuentra en la proteína BPI, siendo un dominio crítico para la actividad de transferencia de lípidos.

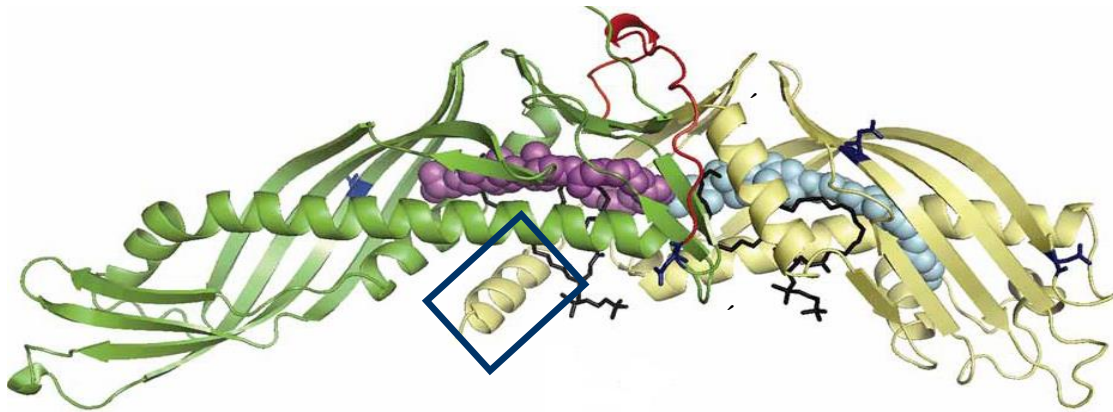


Figura 1. Estructura tridimensional obtenida a partir del cristal de CETP. En verde se muestra el barril N y en amarillo el C, la conexión entre ambos dominios se encuentra marcada en rojo. En magenta y cyan se presentan dos moléculas de éster de colesterol, los fosfolípidos están representados en negro. El dominio C-terminal nombrado hélice-X está enmarcado en un recuadro azul. La estructura fue obtenida del Protein Data Bank (PDB), código de acceso: 2obd.

La Figura 2 muestra una imagen representativa de los últimos 24 residuos en el C-terminal de CETP (aa 453-476), integrado por una hoja- β (G₄₅₃-G₄₆₂) y la estructura α -hélice (E₄₆₅-S₄₇₆), estas regiones están conectadas por un segmento de tres residuos (aa 462-464). La determinación de la estructura tridimensional ha sentado una base sólida para la propuesta de que CETP podría unirse sólo a una lipoproteína a la vez, y llevar a cabo su función a través de un mecanismo acarreador durante la transferencia de lípidos [6]; sin embargo, no hay resultados definitivos que expliquen la forma a través de la cual los ésteres de colesterol localizados en el núcleo de las partículas HDL pueden ser transferidos a las lipoproteínas, y el papel del dominio C-terminal durante este proceso.

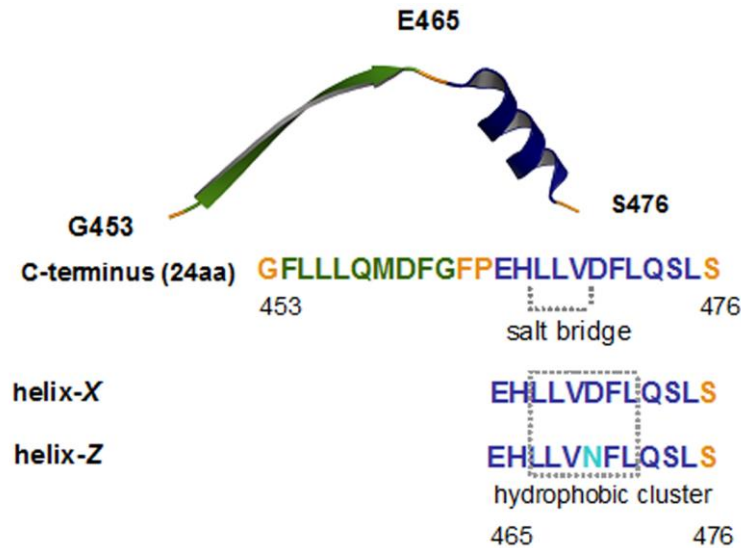


Figura 2. Representación estructural de los últimos 24 residuos en el C-terminal de CETP, mostrando la secuencia de aminoácidos de la hélice-X y la hélice-Z (D₄₇₀N). El puente salino H₄₆₆-D₄₇₀ y el clúster hidrofóbico se encuentran marcados. La estructura fue obtenida del PDB: 2obd.

Varios estudios han demostrado que el sitio crítico para el proceso de transferencia de lípidos está restringido a los últimos 12 residuos del dominio C-terminal, estructurado como una α -hélice anfipática [3-5]. No obstante, en nuestro grupo de trabajo hemos encontrado que el dominio C-terminal puede presentar cambios conformacionales en un microambiente libre de lípidos cuando el péptido hélice-Z portador de la mutación D₄₇₀N es estudiado. Este comportamiento se debe en parte al cambio del grupo funcional carboxilato con carga negativa en el ácido aspártico, por el grupo amida presente en la asparagina, lo cual origina la pérdida del puente salino que se presenta entre la H₄₆₆ y el D₄₇₀ (Figura 2) [3]. Estas condiciones originan la formación de un núcleo hidrofóbico (⁴⁶⁷LLVNFL⁴⁷³) que favorece la presencia de una estructura secundaria- β , mecanismo acoplado con la formación de estructuras oligoméricas y fibras de tipo amiloide [8], únicamente en condiciones cercanas a un pH neutro, y cuando la carga neta electrostática de la secuencia peptídica se encuentra en un valor de -1. Empleando a la hélice-Z como un péptido modelo, en este trabajo se

estudió el papel de varios arreglos de lípidos como moduladores de la estructura secundaria y potencialmente sobre la formación de fibras amiloides.

En este sentido se ha reportado que bajo condiciones específicas, algunas moléculas de lípido inducen cambios conformacionales en varias proteínas precursoras de amiloides, en adición al papel clave que presentan durante la formación y en la posterior estabilización de las fibras [9-11]. En este caso, la composición específica de lípidos sobre la superficie hidrofílica/hidrofóbica puede ser crítica como sitio de reconocimiento que puede modular posibles cambios conformacionales en la estructura secundaria de las proteínas. Por ejemplo, se ha descrito que lípidos como el ácido lisofosfatídico (LPA), un fosfolípido derivado de la acción enzimática de varias fosfolipasas extracelulares a partir de moléculas precursoras como la lisofosfatidilcolina o el ácido fosfatídico (PA), puede inducir la formación de fibras amiloides en la proteína β 2-microglobulina [12,13].

Nuestros experimentos han permitido proponer que un delicado balance entre la estructura secundaria del dominio C-terminal de CETP, parámetros fisicoquímicos como la carga neta en la secuencia peptídica, y el grado de solvatación en la interface de lípidos, pueden definir el tipo de estructura secundaria adquirida. Modificaciones en este balance promueven alteraciones en la estructura secundaria nativa, de manera que la función de transferencia de lípidos podría modificarse. En este sentido, en nuestro grupo de investigación se descubrió una nueva isoforma de CETP llamada CETPI, cuya única diferencia radica solamente en el dominio C-terminal [14]. La isoforma CETPI se mantiene expresada en el intestino delgado, y no esta presente el segmento clave del C-terminal estructurado en α -hélice, ya que a diferencia de CETP hay un reemplazo de los últimos 24 residuos por una secuencia de 18 residuos con un alto contenido en prolinas y residuos con una carga electrostática positiva (Figura 3).

El análisis de la estructura tridimensional de CETP ha permitido la identificación de la proteína BPI, la cual, es intracelular y presenta la propiedad de unión a LPS [15]. En este sentido, la proteína BPI comparte los elementos estructurales más importantes,

así como un alto grado de similitud en la estructura tridimensional con CETP, aunque tienen una homología muy baja en la secuencia primaria (16 %). De forma interesante, en la superficie cóncava la nueva isoforma CETPI y la BPI no presentan el dominio α -hélice localizado en el C-terminal (hélice-X), y en su lugar ambas proteínas tienen un alto contenido de residuos con carga positiva, lo cual puede representar una característica clave para una potencial función relacionada con la unión a LPS.

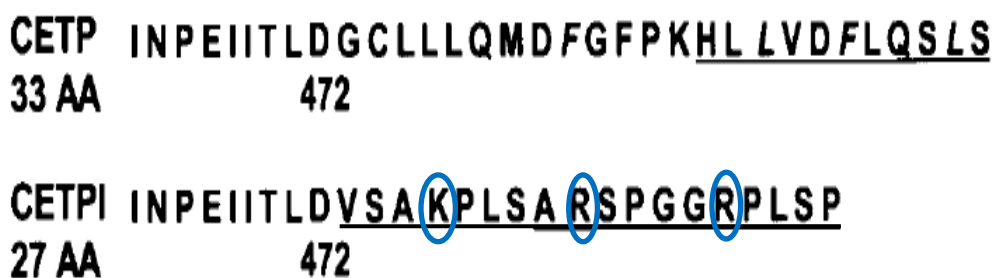


Figura 3. Secuencia de aminoácidos de los dominios C-terminal de CETP y CETPI. En CETPI se encuentran marcados los residuos con carga positiva, mientras que la secuencia de los últimos 18 residuos del C-terminal correspondiente al péptido VSAK se mantiene subrayada.

Los LPS son un componente esencial de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas y representan una condición para mantener su viabilidad. Estos glicolípidos fosforilados son únicos de cada especie, pero en general constan de cuatro componentes: el lípido A, un núcleo interno, un núcleo externo y el antígeno O. El lípido A es el componente hidrofóbico que ancla el LPS a la membrana externa, y se considera el elemento más importante, ya que representa la fracción de mayor toxicidad. En experimentos en donde el lípido A es defosforilado o deacetilado, se encontró una reducción de los efectos tóxicos que induce la molécula [16]. En el torrente sanguíneo, cuando el lípido A de los LPS se mantiene expuesto se lleva a cabo la respuesta inmune. Sin embargo, la desregulación de la respuesta inmune innata después de la infección puede resultar en una inflamación sistémica exacerbada, lo que

lleva a cambios hemodinámicos y alteraciones metabólicas que pueden conducir al desarrollo de choque séptico y fallas multiorgánicas [17,18].

Considerando que los LPS tienen una carga negativa debido a los grupos fosfatos y carboxilo, se ha propuesto que la proteína BPI así como péptidos catiónicos y anfipáticos pueden interactuar con el lípido A [19]. Con base en el análisis estructural entre proteínas transferidoras de lípidos y de unión a LPS, y considerando que la expresión de CETPI es estimulada por los LPS en cultivos de células de intestino delgado, hemos propuesto que la nueva proteína descubierta en nuestro laboratorio puede tener la capacidad de unión a los LPS. En ensayos con péptidos derivados del C-terminal de CETPI, se encontró que la función de unión a LPS reside en este dominio de la proteína. En este sentido, el péptido nombrado VSAK presenta las propiedades fisicoquímicas óptimas para la inactivación de los LPS y considerando que se deriva de CETPI, podría impulsar el desarrollo de tratamientos nuevos contra las complicaciones de los LPS.

Tomando en cuenta que cambios conformacionales en la estructura secundaria en sitios clave pueden modificar la función de las proteínas. En este trabajo se abordó el estudio de CETP y CETPI, con un enfoque específico sobre el dominio C-terminal, sitio en donde reside la única diferencia entre ambas proteínas. Por lo tanto, la hipótesis del presente trabajo está basada en que cambios conformacionales a nivel de estructura secundaria en el segmento clave C-terminal de las proteínas CETP y CETPI pueden definir la función.

Los resultados que se presentan en esta tesis se encuentran basados en la estructura de dos artículos de investigación ya publicados, y uno más que se encuentra en preparación para su envío. En este sentido, los capítulos 4 y 5 corresponden al estudio sobre CETP y el capítulo 6 está enfocado en la función de CETPI. Al final de la tesis, se encuentra un capítulo de conclusiones generales, otro de perspectivas, y un apartado de anexos.

Referencias

- [1] Rye KA, Hime NJ, Barter PJ (1995). The influence of cholesteryl ester transfer protein on the composition, size, and structure of spherical, reconstituted high density lipoproteins. *J Biol Chem* 270, 189-196.
- [2] Klerkx AH, El Harchaoui K, van der Steeg WA, Boekholdt SM, Stroes ES, Kastelein JJ, Kuivenhoven JA (2006). Cholesteryl ester transfer protein (CETP) inhibition beyond raising high-density lipoprotein cholesterol levels: pathways by which modulation of CETP activity may alter atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 706–715.
- [3] Bolaños-García VM, Soriano-García M, Mas-Oliva J (1998). Stability of the Cterminal peptide of CETP mediated through an (*i, i + 4*) array. *Biochim. Biophys Acta* 1384, 7–15.
- [4] Wang S, Wang X, Deng L, Rassart E, Milne RS, Tall AR (1993). Point mutagenesis of carboxyl-terminal amino acids of cholesteryl ester transfer protein. *J Biol Chem* 268, 1955–1959.
- [5] Wang S, Kussie P, Deng L, Tall A (1995). Defective binding of neutral lipids by a carboxyl-terminal deletion mutant of cholesteryl ester transfer protein. Evidence for a carboxyl-terminal cholesteryl ester binding site essential for neutral lipid transfer activity. *J Biol Chem* 270, 612–618.
- [6] Qiu X, Mistry A, Ammirati MJ, Chrnyk BA, Clark RW, et al. (2007). Crystal structure of cholesteryl ester transfer protein reveals a long tunnel and four bound lipid molecules. *Nat Struct Mol Biol* 14, 106–113.
- [7] Beamer LJ (2003) Structure of human BPI (bactericidal/permeability-increasing protein) and implications for related proteins. *Biochem Soc Trans* 31, 791-794.
- [8] García-González V, Mas-Oliva J (2011). Amyloidogenic Properties of a D/N Mutated 12 Amino Acid Fragment of the C-Terminal Domain of the Cholesteryl-Ester Transfer Protein (CETP). *Int J Mol Sci* 12, 2019-2035.
- [9] Andreola A, Bellotti V, Giorgetti S, Mangione P, Obici L, Stoppini M, Torres J, Monzani E, Merlini G, Sunde M (2003). Conformational switching and fibrillogenesis in the amyloidogenic fragment of apolipoprotein A-I. *J Biol Chem* 278, 2444–2451.
- [10] Mendoza-Espinosa P, Moreno A, Castillo R, Mas-Oliva J (2008). Lipid dependant disorder-to-order conformational transitions in apolipoprotein CI derived peptides. *Biochem Biophys Res Commun* 365, 8-15.
- [11] Sheikh AM, Nagai A (2011). Lysophosphatidylcholine modulates fibril formation of amyloid beta peptide. *FEBS J* 278, 634-642.
- [12] Ookoshi T, Hasegawa K, Ohhashi Y, Kimura H, Takahashi N, Yoshida H, Miyazaki R, Goto Y, Naiki H (2008). Lysophospholipids induce the nucleation and extension of beta2-microglobulin-related amyloid fibrils at a neutral pH. *Nephrol Dial Transplant* 23, 3247-3255.

- [13] Pál-Gábor H, Gombos L, Micsonai A, Kovács E, Petrik E, Kovács J, Gráf L, Fidy J, Naiki H, Goto Y, Liliom K, Kardos J (2009). Mechanism of lysophosphatidic acid-induced amyloid fibril formation of beta (2)-microglobulin in vitro under physiological conditions. *Biochemistry* 48, 5689-5699.
- [14] Alonso AL, Zentella-Dehesa A, Mas-Oliva J (2003). Characterization of a naturally occurring new version of the cholesterol ester transfer protein (CETP) from small intestine. *Mol Cell Biochem* 245, 173-182.
- [15] Van Amersfoort ES, Van Berkel TJ, Kuiper J (2003). Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin Microbiol Rev* 16, 379-414.
- [16] Bentala H, Verweij WR, Huizinga-Van der Vlag A, van Loenen-Weemaes AM, Meijer DK, Poelstra K (2002). Removal of phosphate from lipid A as a strategy to detoxify lipopolysaccharide. *Shock* 18, 561-566.
- [17] Schmidtchen A, Malmsten M (2013). Peptide interactions with bacterial lipopolysaccharides. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 18, 381-392.
- [18] Huet O, Chin-Dusting JP (2014). Septic shock: desperately seeking treatment. *Clin Sci (Lond)* 126, 31-39.
- [19] Singh S, Kalle M, Papareddy P, Schmidtchen A, Malmsten M (2013). Lipopolysaccharide interactions of C-terminal peptides from human thrombin. *Biomacromolecules* 14, 1482-1492.

4. Arreglos estructurales clave en el dominio C-terminal de CETP sugieren un mecanismo potencial para la actividad de transferencia de lípidos

4.1 Resumen

CETP promueve la transferencia de lípidos neutros entre lipoproteínas. Con un enfoque en la evaluación de la estabilidad estructural de una serie de péptidos derivados del C-terminal de CETP en un amplio rango de pH y mezclas de lípidos, se estudió su capacidad de llevar a cabo transiciones estructurales desorden-orden dependientes de lípidos. Los estudios sugieren que mientras una mezcla de fosfatidilcolina/ésteres de colesterol forma partículas agregadas, el tratamiento con los péptidos derivados del C-terminal de CETP en una conformación α -hélice estable, permite la formación de estructuras homogéneas de tipo micelar con una reducción en el tamaño de las partículas. Este fenómeno de ordenamiento de lípidos se encontró directamente relacionado con transiciones en la estructura secundaria del dominio C-terminal cuando se evaluaron lípidos como el ácido lisofosfatídico o la lisofosfatidilcolina. El fenómeno descrito fue confirmado a través de dicroísmo circular, experimentos de cosedimentación, microscopía electrónica, y simulaciones de dinámica molecular. Cuando se estudió a la proteína CETP completa, el mismo tipo de fenómeno se llevó a cabo mediante la inducción de la reorganización de los lípidos, originando una reducción del tamaño de las partículas. La propiedad del ordenamiento de lípidos a través de transiciones desorden-orden en el C-terminal podría estar asociada con un posible mecanismo de transferencia de lípidos mediado por CETP.

4.2 Introducción

Varios estudios enfocados en el análisis termodinámico y cinético de la transferencia de lípidos entre vesículas unilamelares de fosfolípidos, muestran que este proceso se puede llevar a cabo por medio de la difusión de monómeros a través de una interface acuosa. De esta forma, la velocidad de intercambio se ha sugerido que ocurre en función de un modelo cinético de micelización que permite una predicción semicuantitativa de la velocidad relativa de transferencia [1]. Cuando el cambio en los valores de energía libre alcanza el punto más alto en la desorción de lípidos de una monocapa de fosfolípidos hacia la interface acuosa, el estado de transición crítico correspondería al último átomo de carbono que se desorbe de la monocapa [2]. De manera que los parámetros cinéticos y termodinámicos asociados a este fenómeno pueden permitir una estimación de la eficiencia de la transferencia para diferentes moléculas de lípidos (Fig. 1). Por ejemplo, el colesterol presenta una barrera energética significativa opuesta a su desorción de una monocapa, con un tiempo medio de transferencia entre dos vesículas del orden de dos horas, en donde el ΔG_t correspondería a 55 kJ/mol.

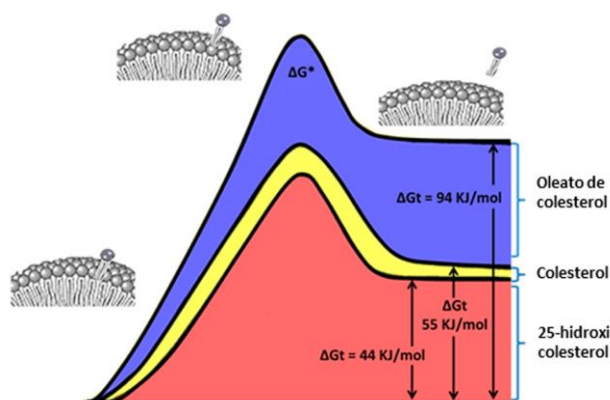


Fig. 1. Diagrama de energía libre para el intercambio de lípidos a través de una fase acuosa. La transferencia de moléculas de lípido desde vesículas unilamelares de fosfolípidos a una fase acuosa procede a través de un estado de transición, en donde una molécula de lípido anfipático se mantiene unida a la vesícula a través del extremo de la cadena hidrófoba. La formación de este complejo estado-activado está asociado con una energía de activación (ΔG^*) alta, que excede la energía de transferencia (ΔG_t) por una cantidad que está determinada, en parte, por las limitaciones de la molécula de lípido con respecto a la superficie de la vesícula [3].

Cuando la polaridad del colesterol es modificada con la unión de un ácido graso, como en el éster de colesterol, la transferencia excede la escala de tiempo de la mayoría de los procesos biológicos ya que la operación tendría que ocurrir en 10^7 h, con un ΔG_t cercano a 94 kJ/mol. En contraste, la simple adición de un grupo hidroxilo promueve una desorción relativamente rápida, tal como ocurre en el 25-hidroxicolesterol, dentro de un tiempo de transferencia de alrededor de 2 min y un ΔG_t de 44 kJ/mol [3]. A partir de este tipo de análisis, podemos concluir que la transferencia de lípidos neutros a través de una fase acuosa es un evento biofísico con un costo energético alto. De manera que la naturaleza ha desarrollado una serie de proteínas transferidoras de lípidos, tales como la CETP con propiedades estructurales únicas diseñadas para reducir de manera eficiente la barrera energética para la transferencia de ésteres de colesterol a través de un ambiente acuoso, no sólo entre lipoproteínas sino también entre la membrana plasmática celular y las lipoproteínas. Sin embargo, las propiedades fisicoquímicas del proceso asociadas con las características estructurales de esta proteína que ayuden a explicar el proceso de transferencia de lípidos aún no han sido descritas a detalle. El presente estudio propone una nueva perspectiva para este mecanismo, tomando en consideración que la transferencia de lípidos llevada a cabo por CETP asociado a un cambio mínimo de entropía podría mantener el equilibrio termodinámico del proceso.

Recientemente, la estructura cristalográfica de CETP a 2.2 Å de resolución ha revelado un túnel de 60 Å con dos moléculas de éster de colesterol en el interior [4]. Estudios de mutagénesis han demostrado que la región flexible del C-terminal de CETP estructurada como una α -hélice anfipática, corresponde con una región clave en el proceso de transferencia [5,6]. De manera interesante, considerando que la superficie cóncava en forma de boomerang de CETP corresponde con el radio de curvatura de las partículas HDL, la posición de la α -hélice del C-terminal permitiría la interacción óptima con la superficie de este tipo de lipoproteínas [7,8]. Posiblemente, la orientación adoptada de esta región helicoidal se lleva a cabo de manera paralela a la superficie de

las HDL en la interface hidrofílica/hidrofóbica de los fosfolípidos, como se ha propuesto en hélices anfipáticas contenidas en varias apolipoproteínas humanas [7-9].

Considerando que los lípidos neutros pueden estar contenidos en CETP y los principios básicos que permitirían a estos lípidos alcanzar el núcleo del túnel no han sido resueltos, asimismo basados en trabajo previo de nuestro grupo de investigación [7-9], se ha abordado el estudio de las propiedades estructurales asociadas a la interacción con lípidos del dominio clave C-terminal de CETP. Con base en nuestros resultados se propone un mecanismo de ordenamiento de lípidos que permite la formación de estructuras de tipo micelar sustentado por transiciones de estructura secundaria en la región C-terminal anfipática de CETP.

4.3 Materiales y métodos

La L- α -fosfatidilcolina (PC), 1-lauroil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (lyso-C₁₂PC), 1-hexanoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (lyso-C₆PC) y el 1-oleoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfato (LPA) fueron obtenidos de Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). El colesterol y los ésteres de colesterol fueron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Síntesis de péptidos

Los péptidos con un grado de pureza mayor al 98% fueron sintetizados por GenScript (Piscataway, NJ), su identidad y pureza fueron confirmadas por espectrometría de masas y cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Los péptidos liofilizados se disolvieron en un amortiguador de carbonatos (pH 9.5) a una concentración de 1 mg/mL. A partir de esta solución se llevó a cabo una dilución 1:5. Para evaluar la estructura secundaria a pH 3.8 y 4.8 se utilizó un amortiguador de acetatos, para pH 6.3 y 7.2 se utilizó un amortiguador de fosfatos, y para valores de pH entre 8.6 y 9.5 se empleó un amortiguador de carbonatos. En todos los casos, agua MilliQ ultrapura fue utilizada, junto con una etapa de filtración a través de 0.22 μ m. La

concentración de los péptidos se determinó a través de la absorbancia del enlace peptídico a 205 nm.

Las muestras de péptidos a una concentración de 200 µg/mL se incubaron con las diferentes preparaciones de lípidos por 12 h a 25°C antes de su caracterización estructural empleando dicroísmo circular (DC), dispersión dinámica de luz (DLS) y microscopía electrónica de transmisión (MET). De la misma manera, la CETP purificada se incubó en las diferentes preparaciones de lípidos.

Se emplearon varios predictores de estructura secundaria: el servidor de predicción de estructura de proteínas PSIPRED; Agadir, un algoritmo para predecir el contenido helicoidal de péptidos; SOPMA (método de predicción auto-optimizado con alineamiento); el programa Protean DNASTar y Rosetta Design. Los giros helicoidales se obtuvieron usando el programa Protean DNASTar (Lasergene).

Dicroísmo circular

Los espectros de DC fueron registrados con un espectropolarímetro Aviv 62DS (AVIV instruments) a 25°C en un rango de 190-260 nm. Los experimentos fueron obtenidos a una concentración de 200 µg/mL de péptido en una celda de cuarzo de 0.1 cm, usando un tiempo promedio de integración de 2.5 s y un tamaño de paso de 0.5 nm. Los resultados de DC se reportaron en valores de elipticidad molar media (Θ , deg cm² dmol⁻¹) considerando la corrección realizada con las soluciones base.

Preparación de mezclas de lípidos

Con el fin de obtener las concentraciones deseadas de fosfatidilcolina (PC) y ésteres de colesterol en las diferentes preparaciones, los lípidos se mezclaron en cloroformo y se secaron durante 6 h bajo un flujo suave de N₂, y un período adicional de 24 h en vacío en un concentrador SpeedVac (Savant). Las mezclas de lípidos se prepararon con una relación molar de PC 2 mM y ésteres de colesterol 100 µM. Después del secado, los lípidos se resuspendieron en un amortiguador de fosfatos pH 6.8, y posteriormente fueron sonicados por 4 ciclos de 10 min con pulsos de 15 s por 30

s de descanso, bajo un flujo de N_2 usando un ultrasonicador Sonifier 250 (Branson). Las muestras se dejaron equilibrar por 2 h a $25^\circ C$, y fueron centrifugadas a 13000 rpm por 10 min.

Purificación de CETP de plasma humano

La CETP se purificó usando un procedimiento inicial de ultracentrifugación y varias etapas secuenciales de cromatografía [10]. En resumen, el plasma libre de lipoproteínas se aisló de muestras frescas de plasma humano a través de ultracentrifugación usando un rotor TLA 100.4. La fracción clara de lipoproteínas fue cargada en una columna fenil-Sefarosa preequilibrada con un buffer 4 M NaCl/10 mM Tris /2 mM EDTA pH 7.4. Las proteínas fueron eluidas en dos pasos, con un buffer 150 mM NaCl/10 mM Tris/2 mM EDTA y agua ultrapura Milli-Q. Las fracciones eluidas con agua se aplicaron a una columna de intercambio aniónico (resina Q sefarosa Fast Flow), y se eluyeron con un gradiente de 0-1.0 M de NaCl. Finalmente, las fracciones obtenidas entre 720 y 850 mM de NaCl se aplicaron a una columna de concanavalina A-Sefarosa, en donde la elución de CETP se obtuvo usando α -metil-D-manosido (150 mM).

Dispersión dinámica de luz (DLS)

El análisis de las muestras a través de DLS se realizó empleando el equipo Malvern Zetasizer Nano a $25^\circ C$ inmediatamente después de las mediciones de DC. La intensidad de la luz dispersada se midió en un ángulo de 173° .

Simulaciones de dinámica molecular

Simulaciones a través del método Coarse Grained o grano grueso (CG) se realizaron en condiciones de frontera periódica usando la versión GROMACS MD versión 3.3.3 [11], y se llevaron a cabo en el conjunto del NPT. Las moléculas de agua y lípido se acoplaron por separado a un termostato Berendsen a $300^\circ K$ con un período de 1 ps. La presión fue isotrópicamente controlada a 1 bar usando un barostato

Berendsen [12] con una compresibilidad isoterma de $5 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$. Las coordenadas para la hélice- X^{12} de CETP se obtuvieron a partir de los datos disponibles de difracción de rayos X (PDB:2obd) [4]. El campo de fuerza MARTINI (versión 2.0) fue empleado para modelar todas las moléculas de CG [13]. De acuerdo a lo propuesto anteriormente por nuestro grupo para las estructuras de CG, los lípidos fueron parametrizados usando cuatro esferas para la cabeza de PC y los primeros 2 a 3 grupos $-\text{CH}_2$ del tensoactivo, y un máximo de tres esferas hidrofóbicas adicionales para el resto de la cadena acilo [14]. Mezclas al azar integradas de 234 moléculas de lípidos, 23415 aguas Martini (equivalentes a 93,660 moléculas atómicas de agua), 1 péptido hélice X^{12} y 2Na^+ se introdujeron en cajas rómbicas dodecaedricas (longitud de la arista 15 nm). Cada sistema se redujo al mínimo de energía utilizando el método de descenso más agudo y posteriormente tres trayectorias independientes largas de 5 μs por cada sistema representado, a partir de diferentes velocidades aleatorias iniciales. Un corte de 1.2 nm fue empleado para interacciones no-covalentes. El potencial L-J fue desplazado suavemente hacia cero entre 0.9 y 1.2 nm. Un enfoque similar se empleó para las interacciones electrostáticas, considerando un potencial de Coulomb con una permitividad relativa de 15 junto con una función de desplazamiento de 0 a 1.2 nm. La lista adyacente fue actualizada cada 10 pasos. El análisis de las trayectorias se realizó utilizando las herramientas del paquete GROMACS, RasMol 2.7 y Pymol 0.99. Asimismo, los detalles de la metodología se pueden encontrar en un estudio reciente de nuestro grupo [14].

Microscopía electrónica de transmisión

Las muestras de péptidos y de CETP incubadas con las diferentes mezclas de lípidos fueron procesadas usando la técnica de tinción negativa, y visualizadas mediante microscopía electrónica de transmisión (MET). Las muestras (10 μL) se colocaron en rejillas de cobre recubiertas de carbon por 10 min a 25°C antes de realizar las observaciones. Considerando que en nuestra experiencia el contraste de muestras con tinción negativa se puede mejorar mediante el uso de rejillas con recubrimientos de

carbon ligeramente más gruesos, de acuerdo a la tabla de referencia de color proporcionado por la empresa Drukker International, se expusieron las rejillas de cobre a los vapores de carbon por periodos de tiempo más largos hasta tener un espesor de 100 nm, para la visualización de las estructuras lípido/CETP. El exceso de líquido se eliminó con papel Whatman y las rejillas se contrastaron por 5 min con 2 % de acetato de uranilo. Las muestras se secaron por 20 min, y las imágenes se adquirieron usando un microscopio JEOL JEM-1200EX11 a 70 kV con una magnificación de 60000x.

Ensayos de cosedimentación lípido/péptido y espectroscopía del enlace peptídico

Con el objetivo de evaluar la unión de los péptidos derivados de CETP a los agregados de lípidos, experimentos de cosedimentación fueron realizados usando ultracentrifugación con un equipo Optima TLX (Beckman) y el uso de un rotor TLA-100.2 [15]. Las muestras que consisten de péptidos, lípidos, o mezcla péptido/lípido fueron centrifugadas a 200,000 g por 12 h para descartar liposomas. Cuando se usaron lyso-C₁₂PC y LPA, una etapa adicional de centrifugación se llevó a cabo a 300,000 g por 36 y 54 h, respectivamente. La temperatura de centrifugación fue de 13°C. Los sobrenadantes se recuperaron y los sedimentos se suspendieron en un amortiguador de fosfatos pH 7.2. Posteriormente, se midió la absorbancia de los sobrenadantes y de los sedimentos resuspendidos a 205 y 218 nm.

Electroforesis en geles nativos de gradiente de poliacrilamida

Los sedimentos obtenidos en los ensayos de cosedimentación péptido/lípido se analizaron a través de electroforesis no desnaturizante en geles de gradiente de poliacrilamida. Las muestras fueron procesadas usando gradientes de poliacrilamida de 3-35%, 3-38% y 3-40 % utilizando un amortiguador Tris-boratos por 16 h a 80 V. Posteriormente, los geles de gradiente se tiñeron con azul de Coomassie G-250 [16].

4.4 Resultados y discusión

La estructura tridimensional de la región C-terminal de CETP (aa 453-476) compuesta de una hoja- β (aa 453-462) y la α -hélice nativa (aa 465-476) nombrada hélice- X^{12} se muestra en la Fig. 2. Cuando el ácido glutámico 465 es sustituido por un residuo de cisteína, como se muestra a continuación, características particulares se desarrollan en la estructura secundaria con este nuevo péptido modelo conocido como hélice- Y^{12} (Fig. 2A). El péptido hélice- Y^{12} cuando se coloca en solución y se incuba a diferentes pH, mantiene la mayor parte de su estructura α -helicoidal dentro de un amplio rango de pH (6.3-9.5) cuando es estudiado por DC (Fig. 2B). Esta situación no ocurre cuando el péptido nativo hélice- X^{12} es evaluado, ya que los experimentos de DC muestran que la estructura secundaria se pierde y el péptido mantiene una conformación desordenada independiente de los valores de pH (Fig. 2C). Las características particulares mostradas por el péptido hélice- Y^{12} constituyen un elemento clave en el desarrollo de varias patentes realizadas por nuestro grupo [17-20].

Por otro lado, bajo el mismo intervalo de pH cuando una mezcla de lípidos compuesta de fosfatidilcolina y ésteres de colesterol se estudió mediante DLS, agregados promedio de 30 nm se forman dentro de un rango que va de 20 a 80 nm. Estas muestras cuando se estudiaron por microscopía electrónica de transmisión confirmaron el tamaño de la mayoría de los agregados (Fig. 3A y B). Es interesante observar que cuando el péptido hélice- Y^{12} se incuba junto con la misma mezcla de lípidos en valores de pH cercanos a 7.0, se induce la formación de pequeñas micelas homogéneas con un tamaño medio de 6 nm (Fig. 3C y D).

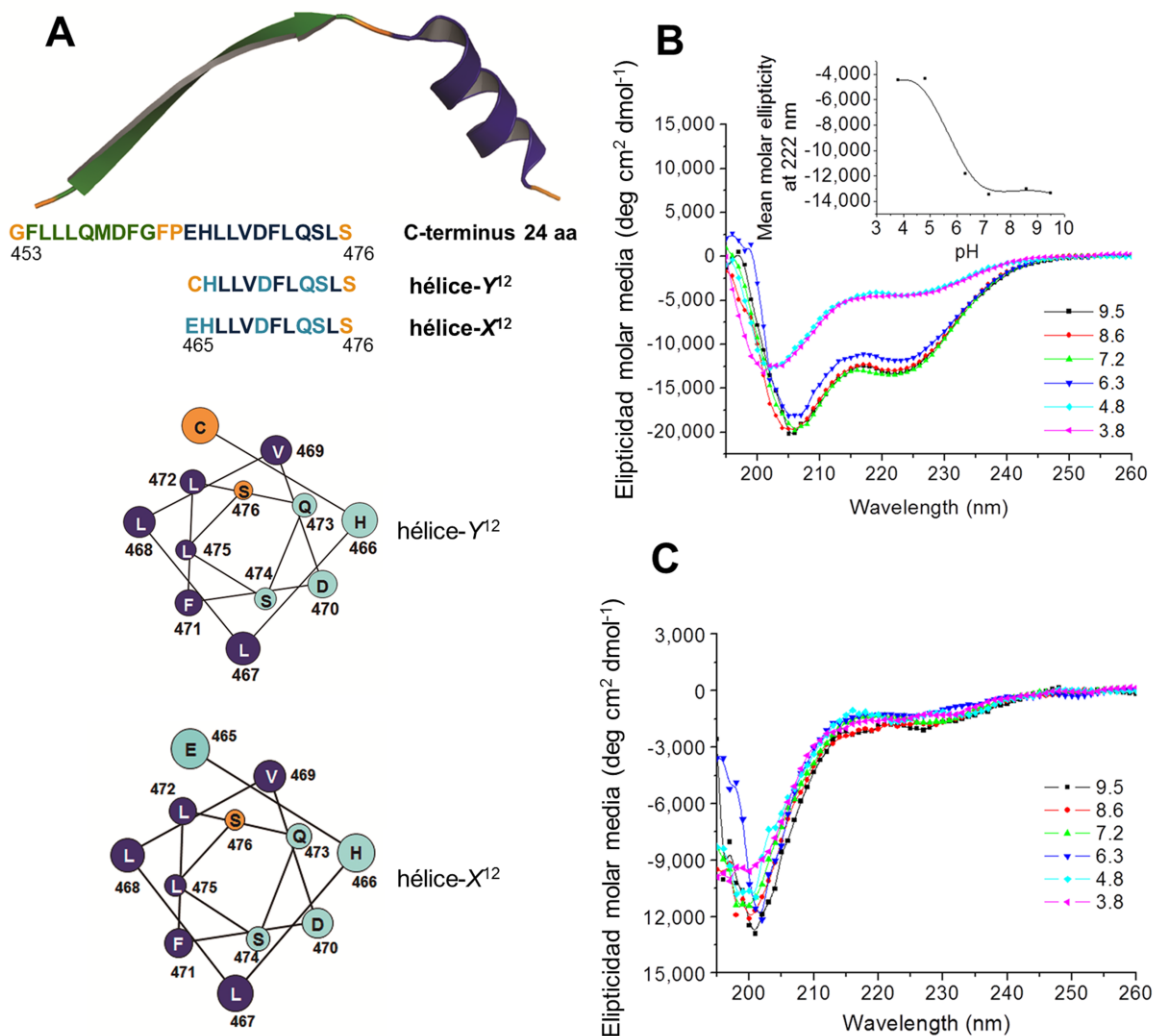


Fig. 2. Caracterización estructural de los péptidos derivados del C-terminal de CETP. **A)** Estructuras primaria y secundaria de la región C-terminal de CETP, que muestran las representaciones helicoidales de la hélice-X¹² y hélice-Y¹² (PDB: 2obd). **B)** Empleando DC, efecto del pH sobre la estructura secundaria de la hélice-Y¹² en presencia de PC y ésteres de colesterol. El inserto muestra el cambio en la elipticidad molar media a 222 nm. **C)** Efecto del pH sobre la estructura secundaria de la hélice-X¹² en la presencia de los mismos lípidos.

Como previamente fue mostrado con la experimentación de DC, valores de pH extremos interfieren con la formación de una estructura secundaria bien definida del péptido, y por lo tanto, se observa solamente la formación de los agregados mayores a 30 nm. Esto es consistente con resultados previos de nuestro laboratorio, los cuales sugieren que las repulsiones electrostáticas y una disminución de puentes de hidrógeno intramoleculares inducen la pérdida de la estructura secundaria en los péptidos, de manera que la agregación es promovida como una etapa inicial en la formación de las fibras amiloides [21,22].

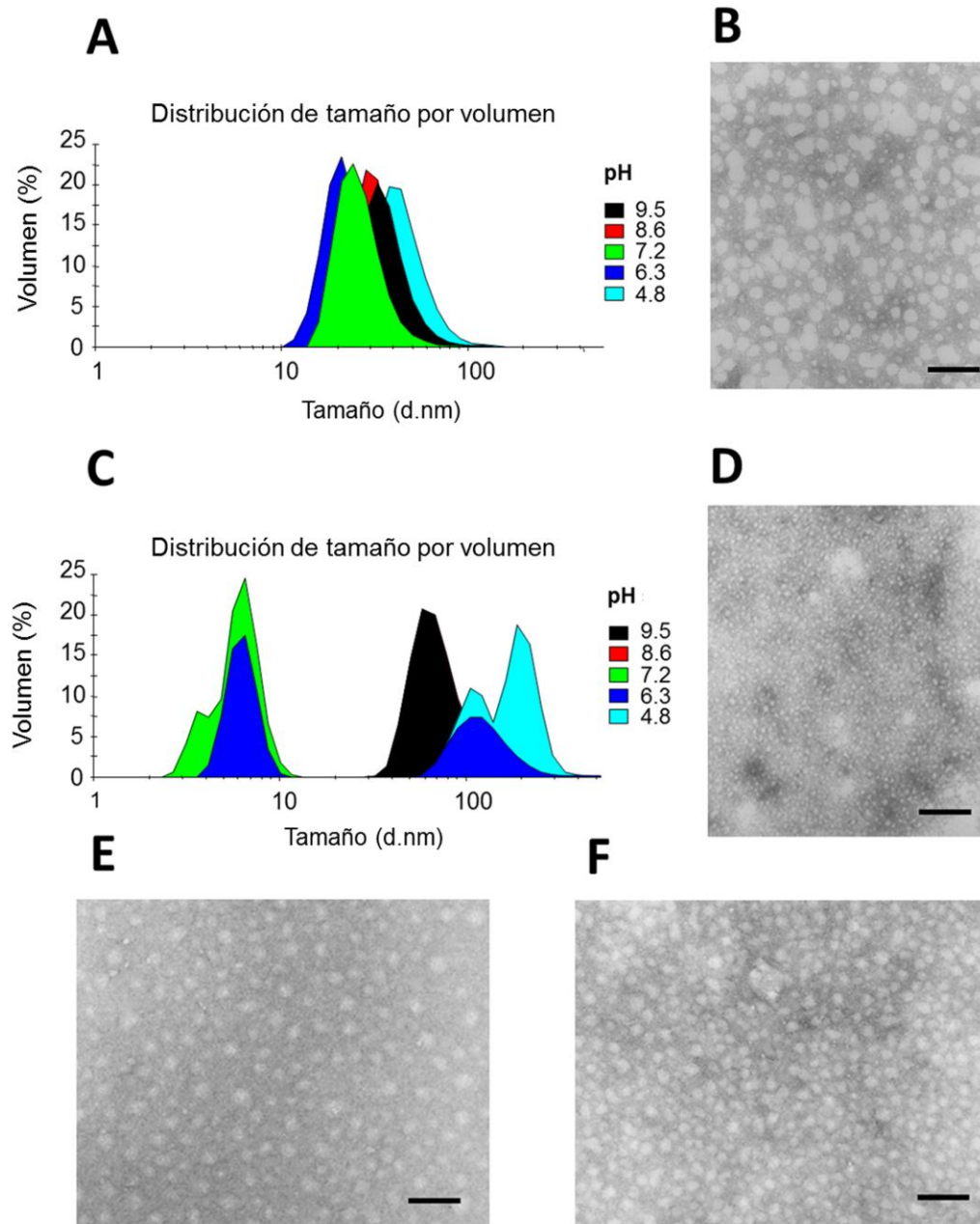


Fig. 3. Formación de estructuras de tipo micelar. **A)** Distribución del tamaño de partícula en muestras compuestas exclusivamente de fosfatidilcolina y ésteres de colesterol medida a través de DLS en un rango de pH 4.8-9.5. **B)** La misma muestra de lípidos en un de pH 7.2 estudiada por MET. **C)** Efecto de la adición del péptido hélice- Y^{12} en la misma mezcla de lípidos estudiado por DLS. La distribución del tamaño de partícula a pH 8.6 no se muestra ya que corresponde exactamente al resultado obtenido a un pH 9.5. **D)** Imagen representativa de la mezcla de lípido/hélice- Y^{12} a un pH de 7.2 obtenido con MET bajo las mismas condiciones experimentales. **E)** Imagen de microscopía electrónica correspondiente a la mezcla control de fosfatidilcolina y ésteres de colesterol estudiada a un pH 7.2, y **F)** más la adición del péptido hélice- X^{12} . Para cada imagen de microscopía electrónica, la barra indica 100 nm.

Uno de los factores que determinan la repulsión electrostática es la carga neta de los péptidos, directamente relacionada con el valor del pH de la solución. En este sentido, a un pH neutro, la carga neta del péptido hélice- Y^{12} es -1.1, condición que permite de manera óptima las interacciones péptido-lípido y por lo tanto el proceso de micelización. En contraste, cuando un pH 6.3 es evaluado, como se muestra en la Fig. 3C una parte de la muestra se mantiene en grandes agregados y otra parte como micelas pequeñas. La explicación para este fenómeno, está relacionada con el hecho de que el péptido hélice- Y^{12} a pH 6.3 presenta una carga neta de -0.6, alejada de la condición óptima para la interacción péptido/lípido. Valores de pH cercanos a los puntos isoeléctricos de ambos péptidos hélice- Y^{12} (5.09) y hélice- X^{12} (4.17) tienden a formar grandes agregados.

Nuestros resultados muestran que el péptido hélice- Y^{12} cuando es evaluado en valores de pH cercanos al fisiológico, permite la estabilización de la α -hélice anfipática del C-terminal, a su vez favorece la capacidad de promover la organización de las estructuras lipídicas de tipo micelar. Bajo las mismas condiciones, aunque en menor grado, el péptido hélice- X^{12} que muestra una conformación desordenada en solución, en la presencia de agregados de lípidos también es capaz de llevar a cabo el fenómeno de ordenamiento de lípidos (Fig. 3E y F).

Cuando se emplearon lípidos específicos, como la 12-lisofosfatidilcolina (lyso- $C_{12}PC$) y el ácido lisofosfatídico (LPA), descritos en nuestro grupo de trabajo de promover la formación de α -hélices en péptidos anfipáticos, el péptido hélice- X^{12} es capaz de mantener una conformación α -helicoidal (Fig. 4A y B; 5A y B) y cuando se visualiza a través de TEM puede promover un efecto de ordenamiento de lípidos (Fig. 4C y D; 5C y D). De manera que la presencia de una estructura α -hélice anfipática puede ser uno de los factores clave para que se lleve a cabo el fenómeno descrito. Adicionalmente, con la finalidad de caracterizar las interacciones péptido/lípido y considerando que los péptidos pueden favorecer el proceso de micelización, empleando las mismas concentraciones que van de 0 a 40 mM para el lyso- $C_{12}PC$ y 0-10 mM para el LPA, se realizaron ensayos de cosedimentación péptido/lípido. La espectroscopía del

enlace peptídico asociado a los sedimentos obtenidos después del proceso de ultracentrifugación mostró que mientras el péptido hélice- X^{12} en solución no sedimenta, la incubación con lípidos en la solución permite la formación de micelas, y sólo bajo esta condición la sedimentación del péptido se lleva a cabo (Fig. 4E y 5E). Cuando fue empleada una velocidad de centrifugación más baja que se usa para sedimentar estructuras como liposomas, durante la experimentación con ambos lípidos ya sea en la ausencia o bajo la presencia del péptido hélice- X^{12} , se encontraron valores de absorbancia mínimos, lo cual indica que la formación de liposomas no es un factor importante a considerar en las condiciones experimentales llevadas a cabo a lo largo del estudio (Fig. 4E). Adicionalmente, la electroforesis en geles nativos de gradiente de poliacrilamida apoya la propuesta de que la formación de micelas, promovida por la presencia del péptido hélice- X^{12} , inicia a bajas concentraciones de lípidos como es mostrado por la presencia de bandas solamente cuando se logra la asociación óptima péptido-lípido (Fig. 4F y 5F).

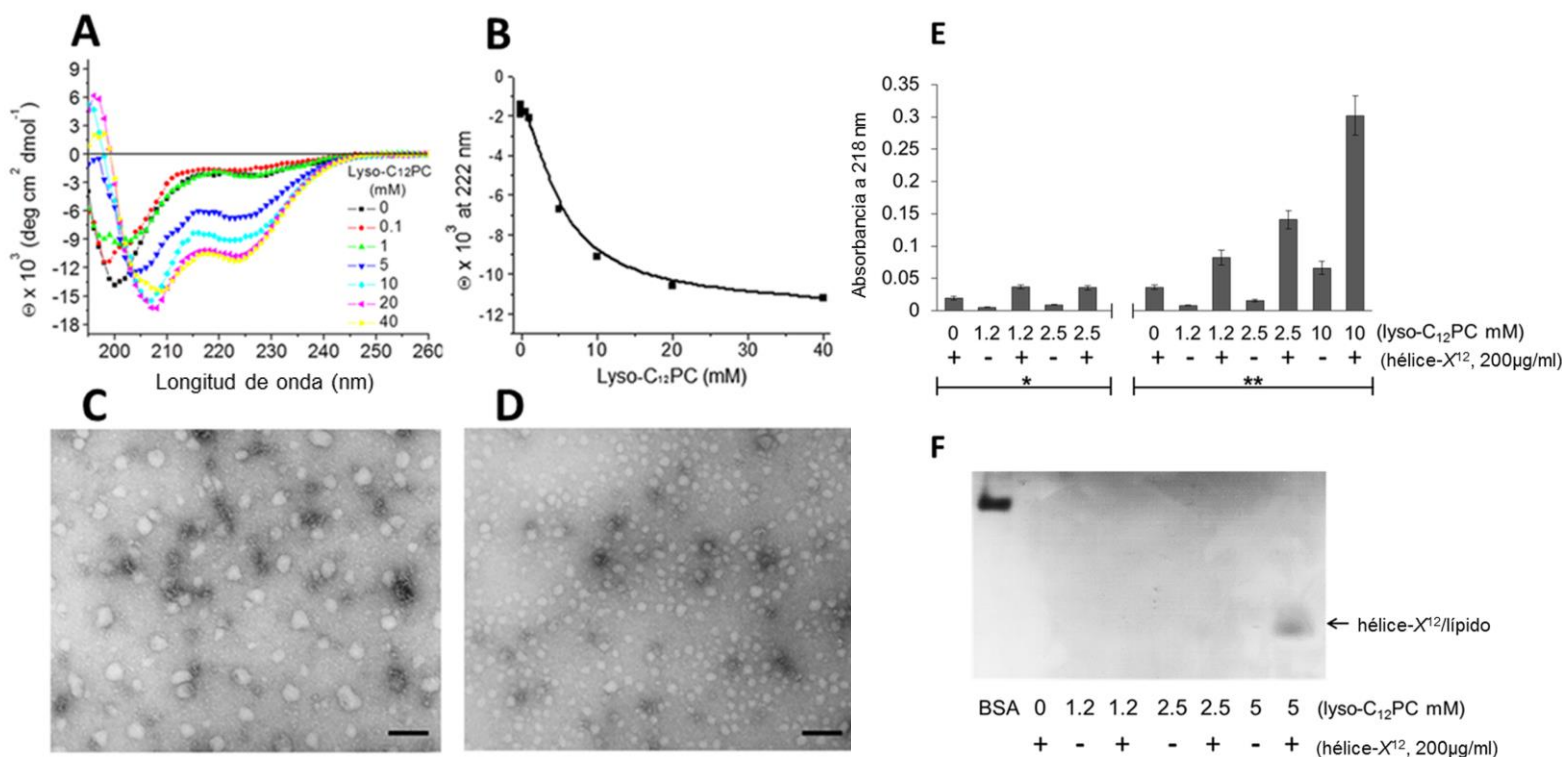


Fig. 4. La lisofosfatidilcolina promueve una conformación estable α -hélice en el péptido hélice-X¹². **A)** Espectros de DC en el péptido hélice-X¹² obtenidos bajo la incubación con 12-lisofosfatidilcolina. **B)** Los valores de elipticidad molar media a 222 nm revelan un aumento en el contenido de estructura α -hélice en el péptido hélice-X¹². **C)** Agregados de lisofosfatidilcolina (10 mM) estudiados por MET a un pH de 7.2. **D)** Efecto de la presencia de la hélice-X¹² en la misma mezcla de lípidos. La barra indica 100 nm. **E)** Ensayos de cosedimentación lisofosfatidilcolina/hélice-X¹² y espectroscopía del enlace peptídico. Los datos indican la media \pm DE de 3 experimentos. Los ensayos de cosedimentation se realizaron a 200,000 g por 12 h (*) y 300,000 g por 36 h (**). **F)** Electroforesis en gels nativos de gradiente de poliacrilamida de los pellets obtenidos a partir de los ensayos de cosedimentation. El gel (3-38%) fue teñido con azul de Coomassie G-250.

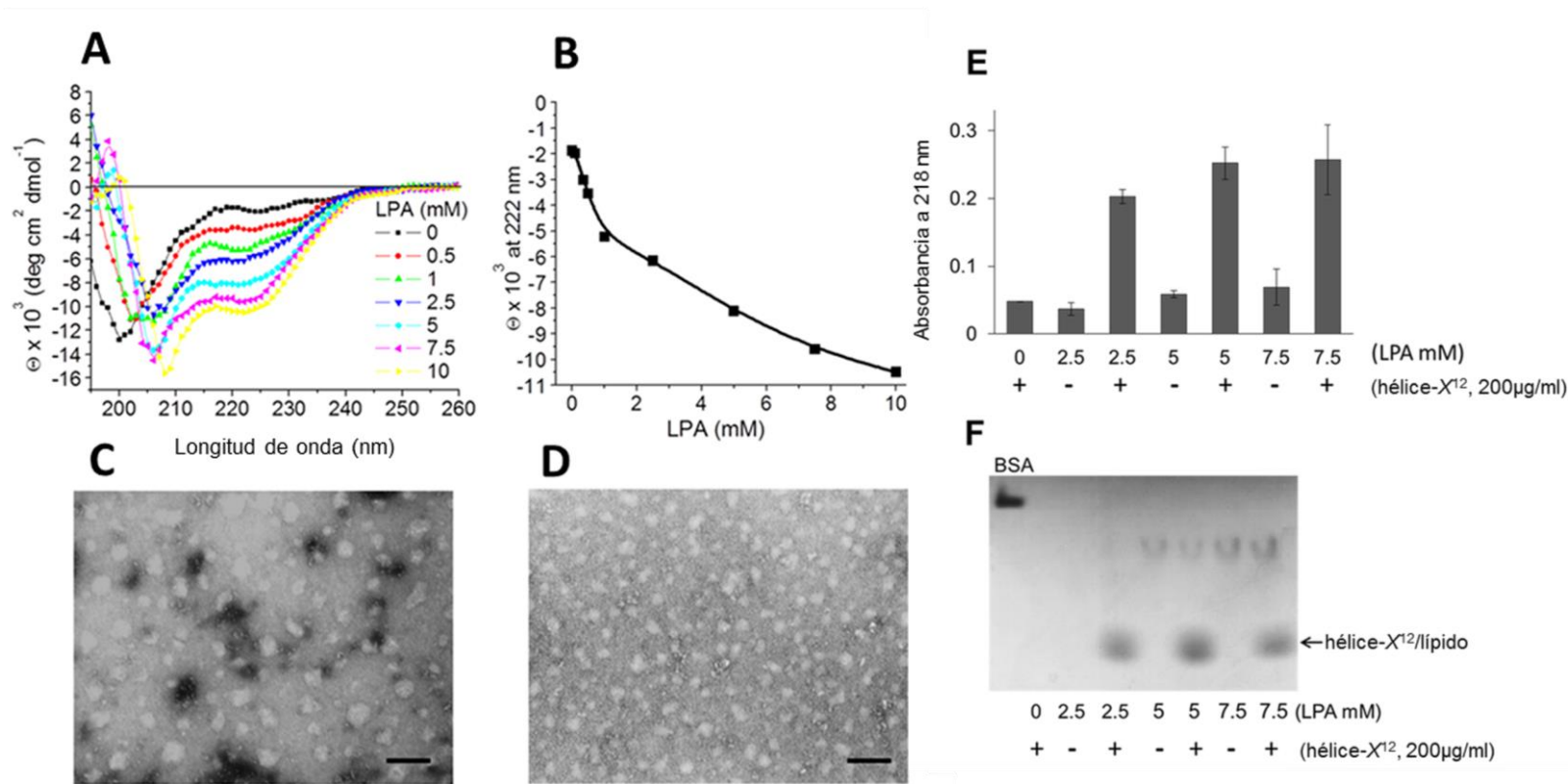


Fig. 5. El ácido lisofosfatídico promueve una conformación estable α -hélice en el péptido hélice-X¹². **A)** Efecto del LPA sobre la estructura secundaria del péptido hélice-X¹² evaluado por DC. **B)** Los valores de elipticidad molar media a 222 nm revelan un incremento en el contenido de α -hélice del péptido hélice-X¹² con respecto a la concentración de lípidos. **C)** Agregados de LPA (10 mM) estudiados por MET a pH 7.2. **D)** Efecto de la presencia del péptido hélice-X¹² sobre la misma mezcla de lípidos. La barra indica 100 nm. **E)** Ensayos de cosedimentación LPA/hélice-X¹² y espectroscopía del enlace peptídico. Los datos mostrados representan la media \pm DE de 3 experimentos. Los ensayos de cosedimentation se realizaron a 300,000 g durante 54 h. **F)** Electroforesis en gels nativos de gradiente de poliacrilamida de pellets obtenidos de los ensayos de cosedimentation. Gel (3-40 %) teñido con azul de Coomassie G-250.

A partir de estos experimentos, es interesante señalar que el proceso de micelización se lleva a cabo cuando el péptido hélice- X^{12} presenta la transición estructural de un estado desordenado hacia una α -hélice (Fig. 4A y B; 5A y B). Precisamente en este punto donde las transiciones de estructura secundaria y el ordenamiento de lípidos se presentan, la relación molar entre los lípidos evaluados y la hélice- X^{12} corresponde a un orden de magnitud de diferencia con un promedio de 35 y 18 moléculas de lyso- $C_{12}PC$ y LPA respectivamente, asociadas a una molécula de péptido. Como se muestra en la Fig. 5F, un aumento en la concentración de LPA no afecta la cantidad de micelas helix- X^{12} /lípidos retenidas en los geles, indicando que debido al número fijo de péptidos colocado en la solución, prácticamente todas las moléculas de péptido se encuentran asociadas a las micelas de lípido independientemente del aumento en la concentración de lípidos. Bajo estas condiciones, las propiedades fisicoquímicas mostradas por el péptido, tales como alta hidrofobicidad y el momento hidrofóbico (μH) pueden representar una fuerza conductora hacia la formación de micelas.

Tomando en cuenta estas consideraciones, la experimentación a través de simulaciones de dinámica molecular empleando CG permitió evaluar el comportamiento del péptido hélice- X^{12} en un ambiente lipídico bien controlado, que consiste de 234 moléculas de lípido, $\sim 93,700$ moléculas de agua y un péptido hélice- X^{12} . Como se muestra en la Fig. 6A, la interacción del péptido hélice- X^{12} con agregados de 12-lisofosfatidilcolina promueve la formación de estructuras de tipo micelar con una media inferior a 70 moléculas de lípido y un péptido por partícula, que muestra tamaños de alrededor de 5 nm. Es interesante observar que las partículas de lípido que no están asociadas con una molécula de péptido tienden a interaccionar entre ellas, mientras que micelas que tienen péptidos parecen ser estables y permanecer en solución. El mismo fenómeno de ordenamiento de lípidos se observa cuando la 16-lisofosfatidilcolina es empleada (Fig. 6B). Lípidos como la 6-lisofosfatidilcolina que presentan una concentración micelar crítica (cmc) alta muestran la tendencia a interaccionar con péptidos de la hélice- X^{12} y organizar micelas unidas a péptidos incluso antes de que las

moléculas de lípidos puedan formar micelas por sí mismas (Fig. 6C). Estos resultados aportan nueva evidencia y apoyan la propuesta de que el péptido hélice- X^{12} de CETP podría facilitar el proceso de ordenamiento de lípidos a través de la formación de estructuras de tipo micelar.

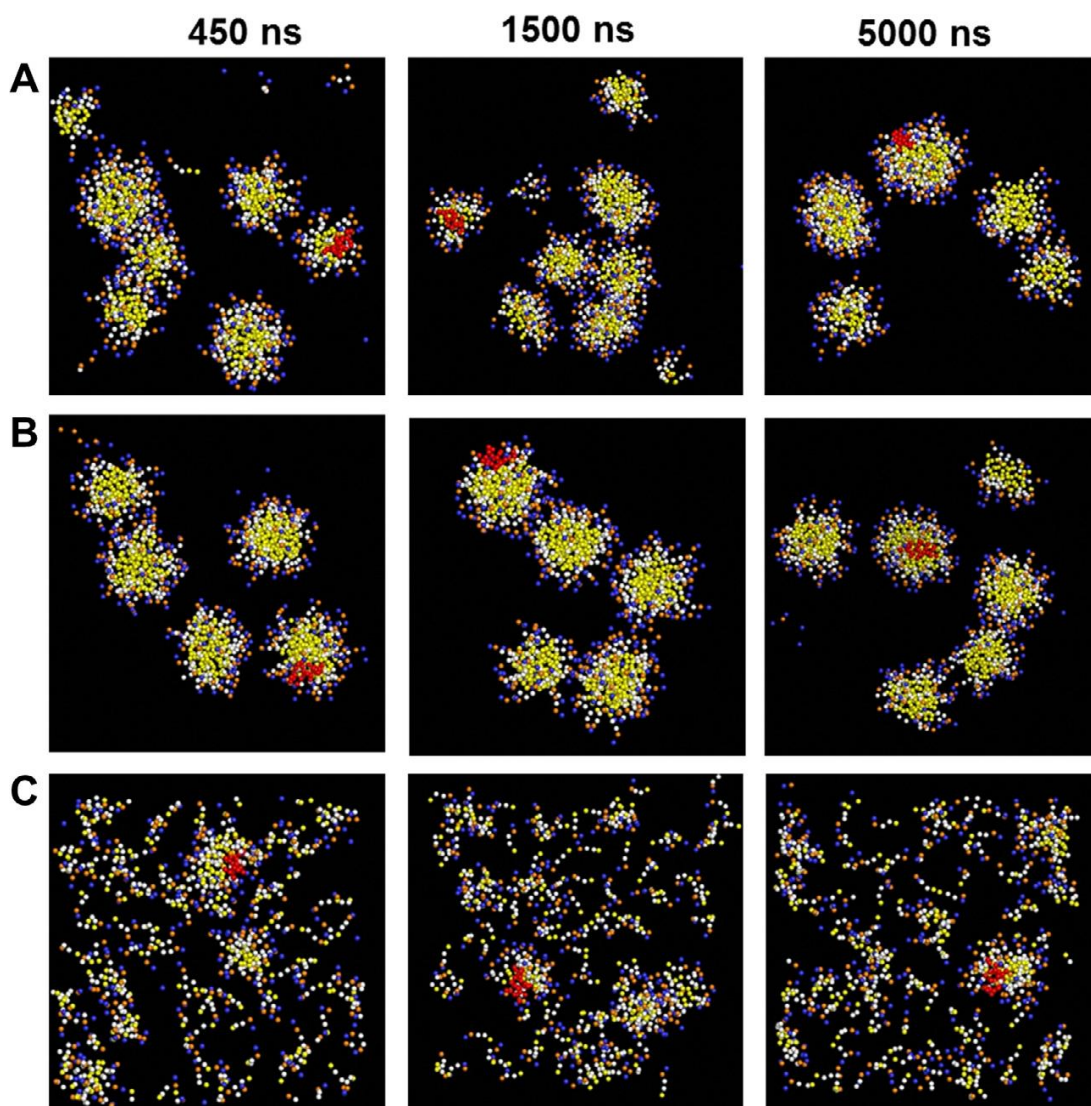


Fig.6. Simulaciones de dinámica molecular de lípidos en la presencia del péptido hélice- X^{12} . Las imágenes fueron obtenidas a 450, 1500 y 5000 ns. El péptido hélice- X^{12} fue incubado con 12-lisofosfatidilcolina (**A**), y 16-lisofosfatidilcolina (**B**). **C**) Bajo la incubación con monómeros de 6-lisofosfatidilcolina, el péptido hélice- X^{12} promueve la organización de micelas alrededor de sí mismo. Las moléculas de péptido se encuentran representadas en rojo y las moléculas de agua no se muestran para mayor claridad.

A partir de este tipo de experimentos y con la finalidad de demostrar que el ordenamiento de lípidos y el concepto de micelización también puede ser llevado a cabo por la proteína completa, se realizaron una serie de experimentos empleando a la CETP nativa. Como se demostró previamente con los péptidos hélice-Y¹² y hélice-X¹² cuando se incuban en una solución que contiene los agregados de lípidos, la CETP purificada a partir de plasma humano (Fig. 7), muestra la capacidad de inducir un fenómeno similar de ordenamiento de lípidos (Fig. 8). Considerando el trabajo previo de nuestro grupo, empleando una serie de péptidos anfipáticos derivados de varias apolipoproteínas [23,24], se propone que el reordenamiento de lípidos a partir de agregados grandes de lípidos no-homogéneos hacía partículas con un alto grado de homogeneidad podría llevarse a cabo debido a la capacidad de CETP, a través de su dominio anfipático C-terminal de promover un desplazamiento del equilibrio y optimizar la posibilidad de la unión de lípidos en un ambiente acuoso.

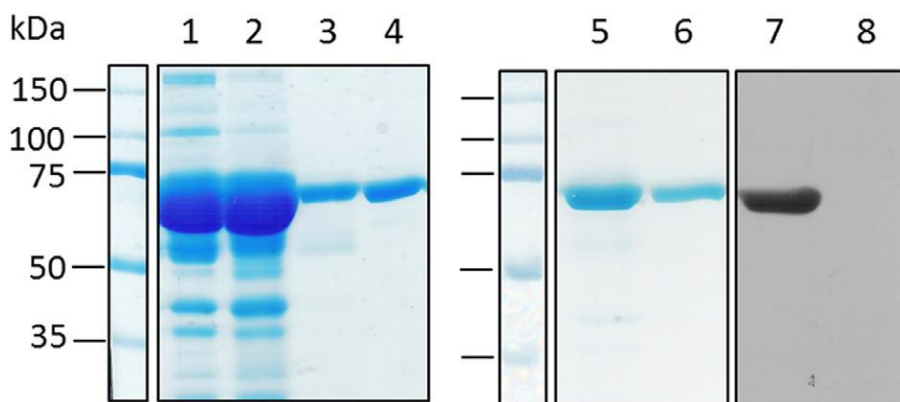


Fig.7. Purificación de CETP de plasma humano. (1) Fracción de plasma libre de lipoproteínas, (2) fracción obtenida después del paso de cromatografía de interacción hidrófoba, (3) fracción eluída con un gradiente de 0-1 M de NaCl (720-850 mM) a través de un paso de cromatografía de intercambio aniónico, (4) albúmina sérica bovina (BSA), (5) CETP purificada, (6) BSA. Los carriles (7) y (8) muestran el análisis de Western blot de las fracciones 5 y 6, respectivamente, empleando un anticuerpo monoclonal anti-CETP.

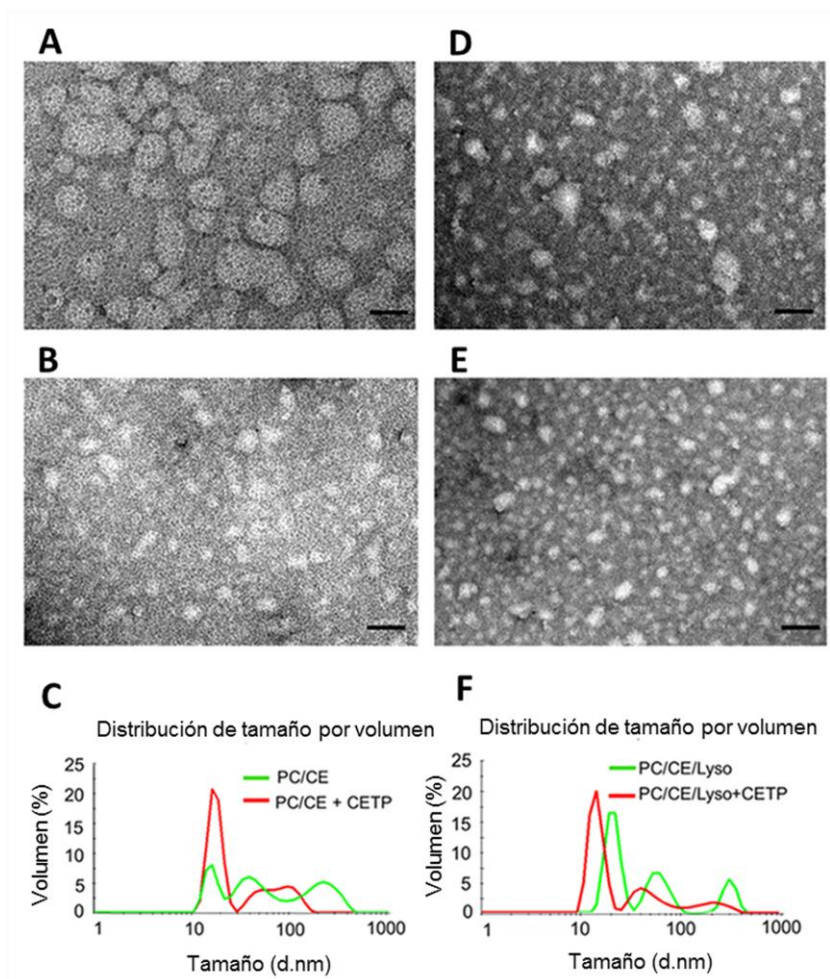


Fig.8. Reorganización de lípidos inducida por CETP. **A)** Agregados de lípidos compuestos de fosfatidilcolina y ésteres de colesterol analizados por TEM. **B)** La incubación de la misma muestra de lípidos con la adición de CETP genera partículas lipídicas mejor organizadas. **C)** Distribución del tamaño de partícula de las dos muestras evaluadas a través de DLS. **D)** Agregados de lípidos compuestos de fosfatidilcolina, ésteres de colesterol (CE) y lisofosfatidilcolina (lyso). **E)** Efecto de CETP en la misma mezcla de lípidos, y **(F)** muestras evaluadas por DLS. La proteína se utiliza a 0.11 μM y los lípidos a 12.7 μM . La barra indica 100 nm.

Los resultados presentados en este estudio empleando lípidos purificados y el uso de estructuras artificiales de lípidos, nos sitúa en una óptima posición para experimentar y comprender mejor el papel de la secuencia C-terminal de CETP durante la transferencia de lípidos entre lipoproteínas humanas. Con base en nuestra hipótesis de trabajo, se está llevando a cabo experimentación por nuestro grupo a través del empleo de monocapas binarias de Langmuir-Blodgett [7,8] y por medio de mediciones de

interferometría en cajas de fuerzas [25], con el objetivo de poder entender, la transferencia de lípidos y el papel de la presión superficial sobre las HDL y su asociación con el desorden local en proteínas como CETP y la lecitin colesterol acil transferasa (LCAT) [26].

En varios trabajos en los cuales se ha abordado el estudio de la estabilidad de las HDL, se les ha considerado como partículas inestables contenidas en una trampa cinética [27]. Debido a esta inestabilidad, varios procedimientos que incluyen el tratamiento térmico [28] y por agentes caotrópicos [27], puede liberar fácilmente a las partículas de esta trampa. Nuestra propuesta presentando una posibilidad alterna que explique la eficiente actividad de transferencia de lípidos llevada a cabo por CETP, podría tener ventaja de este hecho cuando la proteína se une a una partícula de HDL, liberando a la lipoproteína de esta trampa cinética [29]. La liberación y posterior estabilización llevada a cabo en la superficie de las partículas HDL podría ser provocada por los lípidos de la HDL cuando se unen alrededor del dominio C-terminal de CETP. Esta nueva condición estructural sugiere que cambios en la curvatura presentes en CETP a lo largo del eje X podrían estar involucrados con el mecanismo de activación que controla la unión y liberación de CETP de la superficie de la lipoproteína [23,30], así como relacionados con el fenómeno de remodelamiento de las HDL [31,32].

Aunque recientemente Zhang et al. [33] basados en experimentos de microscopía electrónica han propuesto que la transferencia de lípidos podría llevarse a cabo mediante la formación de complejos ternarios entre dos partículas de lipoproteínas y CETP, su interpretación no considera el hecho de que la α -hélice anfipática del C-terminal, probada que es esencial para el proceso de transferencia, no está involucrada en su modelo. Por otra parte, estudios de simulación de dinámica molecular han demostrado recientemente que CETP no es capaz de penetrar más allá de los grupos fosfato de la monocapa de fosfolípidos [34]. Además, no se menciona cómo pueden ser transferidos los triglicéridos y fosfolípidos, junto con los ésteres de colesterol. Aunque dos moléculas de ésteres de colesterol se han asociado directamente con la estructura

tridimensional de CETP, la presencia de estos lípidos neutros en el núcleo de la proteína podría estar asociada con el mantenimiento de su estabilidad estructural. A este respecto, se ha reportado que la proteína bactericida/incrementadora de permeabilidad (BPI), que muestra una potente acción antimicrobiana y se une a los lipopolisacáridos, presenta una alta similitud estructural con CETP. Se ha sugerido que a pesar de esta alta similitud, BPI presenta una estructura tridimensional más abierta y una secuencia C-terminal completamente diferente en comparación con CETP, fenómeno que probablemente debe estar relacionado con el hecho de que BPI aparentemente no interacciona con moléculas de ésteres de colesterol [35]. Si se toma en cuenta que la α -hélice anfipática del C-terminal de CETP podría ser considerada como una región de fuerza orientadora de la misma forma en que los detergentes actúan [36], la propuesta que se describe en este estudio podría apoyar una transferencia de moléculas de lípidos eficiente dentro de los parámetros energéticos adecuados.

La presencia de transiciones conformacionales asociada con la termodinámica del proceso de manera similar a la descrita en este trabajo en el dominio C-terminal de CETP, se ha documentado para otras proteínas de unión a lípidos, tales como la apolipoproteína A-1 [37,38]. Dado que el dominio C-terminal de CETP mantiene una alta flexibilidad intramolecular con un factor-*B* alto asociado a la interacción con lípidos, esta propiedad puede estar directamente asociada con el tipo y concentración de lípidos específicos que podrían permitir o prevenir los cambios en la estructura secundaria [34,39]. Se ha descrito que el LPA en valores cercanos a la cmc, cuando se coloca en contacto con la β 2-microglobulina, promueve la formación y extensión de las fibras amiloide [40,41]. Sin embargo, se encontró que empleando un amplio rango de concentraciones por arriba de la cmc, el LPA y en menor medida la lisofosfatidilcolina, promueven un cambio conformacional hacia estructuras α -helicoidales y previenen la formación de fibras amiloide cuando el péptido hélice-Z (mutación D₄₇₀N) derivado del dominio C-terminal de CETP es estudiado [39]. De manera que el control de cambios conformacionales en sitios específicos de proteínas determinados por lípidos podría ser

tomado como base para el diseño de moléculas similares a lípidos que puedan mantener o estabilizar el estado nativo de proteínas propensas a la agregación [42].

El tipo de organización molecular descrito en nuestro estudio llevado a cabo por el segmento C-terminal de CETP siguiendo transiciones en la estructura secundaria desorden-orden controladas por la presencia de lípidos específicos, desde nuestra perspectiva podría considerarse como un ejemplo de un switch molecular [39,43]. Esto permitiría a la CETP controlar la función bajo condiciones metabólicas específicas y mantener su actividad de transferencia asociada a un cambio mínimo de entropía relacionado con la formación de estructuras de tipo micelar en el segmento C-terminal de la proteína, proceso que reduciría la barrera energética que representa la transferencia de lípidos que se produce en un medio acuoso.

La información plasmada a lo largo del presente capítulo forma parte del artículo: “Key structural arrangements at the C-terminus domain of CETP suggest a potential mechanism for lipid-transfer activity” [Anexo I].

De acuerdo a los resultados experimentales presentados en este capítulo, se extendió el alcance de nuestra propuesta de trabajo, relacionada con la importancia de la estructura α -hélice sobre el dominio C-terminal de CETP para la función proteica. De tal manera que se realizaron una serie de estrategias experimentales que permitieron establecer las bases de la solicitud de patente: “Vacuna de aplicación nasal contra el desarrollo de la enfermedad aterosclerótica y el hígado graso” [Anexo II]. Esta invención consiste de una composición vacunal de administración intranasal, que utiliza una preparación de nanopartículas micelares. La preparación incluye al péptido hélice-Y como inmunógeno, considerando sus propiedades estructurales que permiten la presencia de una estructura secundaria α -hélice, la cual como se ha demostrado previamente es clave para la función. Asimismo, la vacuna incluye a los lípidos fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, así como lípidos membranales de la arqueobacteria *Thermus aquaticus* como una mezcla promotora de la respuesta inmune, con el objetivo de bloquear la función de la CETP a través del dominio C-terminal.

Experimentos *in vivo* realizados en conejos blanco Nueva Zelanda sugieren que la inmunización intranasal con las nanopartículas micelares desarrolladas, disminuye la progresión de la formación de las placas ateroscleróticas, así como del hígado graso de tipo no alcohólico.

4.5 Referencias

- [1] Aniansson EAG, Wall SN, Almgren M, Hoffmann H, Kielmann I et al. (1976). Theory of the kinetics of micellar equilibria and quantitative interpretation of chemical relaxation studies of micellar solutions of ionic surfactants. *J Phys Chem.* 80:905–922.
- [2] Nichols JW (1985). Thermodynamics and kinetics of phospholipid monomer vesicle interaction. *Biochemistry* 24:6390-6398.
- [3] Mc Lean LR, Phillips MC (1984). Kinetics of phosphatidylcholine and lysophosphatidylcholine exchange between unilamellar vesicles. *Biochemistry* 23:4624–4630.
- [4] Qiu X, Mistry A, Ammirati MJ, Chrnyk BA, Clark RW, et al. (2007). Crystal structure of cholesteryl ester transfer protein reveals a long tunnel and four bound lipid molecules. *Nat Struct Mol Biol.* 14:106–113.
- [5] Wang S, Kussie P, Deng L, Tall A (1995). Defective binding of neutral lipids by a carboxyl-terminal deletion mutant of cholesteryl ester transfer protein. Evidence for a carboxyl-terminal cholesteryl ester binding site essential for neutral lipid transfer activity. *J Biol Chem.* 270:612–618.
- [6] Wang S et al. (1993). Point mutagenesis of carboxyl-terminal amino acids of cholesteryl ester transfer protein. Opposite faces of an amphipathic hélix important for cholesteryl ester transfer or for binding neutralizing antibody. *J Biol Chem.* 268:1955–1959.
- [7] Xicohtencatl-Cortes J, Castillo R, Mas-Oliva J (2004). In search of new structural states of exchangeable apolipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 324:467–470.
- [8] Xicohtencatl-Cortes J, Mas-Oliva J, Castillo R (2004). Phase transitions of phospholipid monolayers penetrated by apolipoproteins. *J Phys Chem B.* 108:7307–7315.
- [9] Bolaños-García VM, Soriano-García M, Mas-Oliva J (1997). CETP and exchangeable apoproteins: common features in lipid binding activity. *Mol Cell Biochem.* 175:1–10.
- [10] Ruiz-Noriega M, Silva-Cárdenas I, Delgado-Coello B, Zentella-Dehesa A, Mas-Oliva J (1994). Membrane bound CETP mediates the transfer of free cholesterol between lipoproteins and membranes. *Biochem Biophys Res Commun.* 202:1322–1328.

- [11] Van Der Spoel D et al. (2005). GROMACS: fast, flexible, and free. *J Comput Chem.* 26:1701–1718.
- [12] Berendsen HJC, Postma JPM, Van Gunsteren WF, Dinola A, Haak JR (1984). Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J Chem Phys.* 81:3684–3690.
- [13] Marrink SJ, Risselada HJ, Yefimov S, Tieleman DP, De Vries AH (2007). The MARTINI force field: coarse grained model for biomolecular simulations. *J Phys Chem B* 111:7812–7824.
- [14] Brocos P, Mendoza-Espinosa P, Castillo R, Mas-Oliva J, Piñeiro Á, (2012). Multiscale molecular dynamics simulations of micelles: coarse-grain for selfassembly and atomic resolution for finer details. *Soft Matter* 8:9005–9014.
- [15] Palmer SM, Playford MP, Craig SW, Schaller MD, Campbell SL (2009). Lipid binding to the tail domain of vinculin: specificity and the role of the N and C termini. *J Biol Chem.* 284, 7223–7231.
- [16] Toledo-Ibelle P, García-Sánchez C, Ávila-Vazzini N, Carreón-Torres E, Posadas-Romero C et al. (2010). Enzymatic assessment of cholesterol on electrophoresis gels for estimating HDL size distribution and plasma concentrations of HDL subclasses. *J Lipid Res.* 51:1610–1617.
- [17] Mas Oliva J, García González V, Delgado Coello BA, Pérez A (2012). Fabricación de una Vacuna Terapéutica de Aplicación Nasal contra el Desarrollo de la Aterosclerosis y el Hígado Graso. MX patent application number MX/a/2012/007682.
- [18] Mas-Oliva J, Alonso AL (2010). System for the quantification of the cholesterol ester transfer protein in biological and synthetic samples. US patent 7,749,721.
- [19] Mas-Oliva J, Alonso AL (2007). System for the quantification of the cholesterol ester transfer protein in biological and synthetic samples. EP patent 1,242,446.
- [20] Mas Oliva J, Alonso AL (2007). Sistema para la Cuantificación de la Proteína Transferidora de Ésteres de Colesterol en Muestras Biológicas y Sintéticas. MX patent 246,945.
- [21] Bolaños-García VM, Soriano-García M, Mas-Oliva J (1998). Stability of the C-terminal peptide of CETP mediated through an (i, i+4) array. *Biochim Biophys Acta* 1384:7–15.
- [22] García-González V, Mas-Oliva J (2011). Amyloidogenic properties of a D/N mutated 12 amino acid fragment of the C-terminal domain of the cholesteryl-ester transfer protein (CETP). *Int J Mol Sci.* 12:2019–2035.
- [23] Mendoza-Espinosa P, Moreno A, Castillo R, Mas-Oliva J (2008). Lipid dependant disorder-to-order conformational transitions in apolipoprotein CI derived peptides. *Biochem Biophys Res Commun.* 365:8–15.

- [24] Bolaños-García VM, Ramos S, Castillo R, Xicohtencatl-Cortes J, Mas-Oliva J (2001). Monolayers of apolipoproteins at the air/water interfaces. *J Phys Chem B*. 105:5757–5765.
- [25] Ramos S, Campos-Terán J, Mas-Oliva J, Nylander T, Castillo R (2008). Forces between hydrophilic surfaces adsorbed with apolipoprotein AII alpha helices. *Langmuir* 24: 8568–8575.
- [26] Aguilar-Espinosa SL, Mendoza-Espinosa P, Delgado-Coello BA, Mas-Oliva J (2013). Lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) activity in the presence of Apo-AI-derived peptides exposed to disorder-order conformational transitions. *Biochem Biophys Res Commun*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.10.089>.
- [27] Mehta R, Gantz DL, Gursky O (2003). Human plasma high-density lipoproteins are stabilized by kinetic factors. *J Mol Biol*. 328:183–192.
- [28] Sparks DL, Lund-Katz S, Phillips MC (1992). The charge and structural stability of apolipoprotein A–I in discoidal and spherical recombinant high density lipoprotein particles. *J Biol Chem*. 267:25839–25847.
- [29] Guha, M., Gao, X., Jayaraman, S., Gursky, O., 2008. Correlation of structural stability with functional remodeling of high-density lipoproteins: the importance of being disordered. *Biochemistry* 47, 11393–11397.
- [30] Hall J, Qiu X (2011). Structural and biophysical insight into cholesteryl ester transfer protein. *Biochem Soc Trans*. 39:1000–1005.
- [31] Maugeais C, Perez A, von der Mark E, Magg C, Pflieger P et al. (2013) Evidence for a role of CETP in HDL remodeling and cholesterol efflux: role of cysteine 13 of CETP. *Biochim Biophys Acta* 1831:1644–1650.
- [32] Niesor EJ, Magg C, Ogawa N, Okamoto H, von der Mark E et al. (2010). Modulating cholesteryl ester transfer protein activity maintains efficient pre-b-HDL formation and increases reverse cholesterol transport. *J Lipid Res*. 51:3443–3454.
- [33] Zhang L, Yan F, Zhang S, Lei D, Charles MA et al. (2012). Structural basis of transfer between lipoproteins by cholesteryl ester transfer protein. *Nat Chem Biol*. 8:342–349.
- [34] Koivuniemi A, Vuorela T, Kovanen PT, Vattulainen I, Hyvönen MT. (2012). Lipid exchange mechanism of the cholesteryl ester transfer protein clarified by atomistic and coarse-grained simulations. *PLoS Comput Biol*. 8:e1002299.
- [35] Beamer LJ (2003). Structure of human BPI (bactericidal/permeability-increasing protein) and implications for related proteins. *Biochem Soc Trans*. 31:791–794.
- [36] Tanford C (1978). The hydrophobic effect and the organization of living matter. *Science* 200:1012–1018.

- [37] Kono M, Okumura Y, Tanaka M, Nguyen D, Dhanasekaran P, et al. (2008). Conformational flexibility of the N-terminal domain of apolipoprotein a-I bound to spherical lipid particles. *Biochemistry* 47:11340–11347.
- [38] Oda MN, Forte TM, Ryan RO, Voss JC (2003). The C-terminal domain of apolipoprotein A-I contains a lipid-sensitive conformational trigger. *Nat Struct Biol.* 10: 455–460.
- [39] García-González V, Mas-Oliva J (2013). Amyloid fibril formation of peptides derived from the C-terminus of CETP modulated by lipids. *Biochem Biophys Res Commun.* 434: 54–59.
- [40] Pál-Gábor H, Gombos L, Micsonai A, Kovács E, Pretrik É, et al. (2009). Mechanism of lysophosphatidic acid-induced amyloid fibril formation of beta (2)-microglobulin in vitro under physiological conditions. *Biochemistry* 48:5689–5699.
- [41] Ookoshi T, Hasegawa K, Ohhashi Y, Kimura H, Takahashi N et al. (2008). Lysophospholipids induce the nucleation and extension of beta2-microglobulin-related amyloid fibrils at a neutral pH. *Nephrol Dial Transplant.* 23:3247–3255.
- [42] García-González VG, Mas-Oliva J. (2012). El Concepto de Enfermedad Asociado a la Conformación de Proteínas, first ed. Universidad Nacional Autónoma de México and El Manual Moderno, México.
- [43] Mendoza-Espinosa P, García-González V, Moreno A, Castillo R, Mas-Oliva J (2009). Disorder-to-order conformational transitions in protein structure and its relationship to disease. *Mol Cell Biochem.* 330:105–112.

5. Formación de fibras amiloides en péptidos derivados del C-terminal de CETP modulada por lípidos

5.1 Resumen

La mutación D₄₇₀N en los últimos 12 residuos del dominio C-terminal de CETP promueve un cambio conformacional hacia una estructura secundaria de tipo- β . A su vez, esta modificación conduce a la formación de oligómeros y estructuras fibrilares, las cuales causan efectos citotóxicos similares a los inducidos por péptidos de tipo amiloide. En este estudio se evaluó el papel de arreglos específicos de lípidos sobre la estructura del péptido hélice-Z, portador de la mutación D₄₇₀N, a través del uso de fluorescencia acoplada a tioflavina T, la absorbancia del enlace peptídico, dicroísmo circular y microscopía electrónica. Los resultados indican que el uso de micelas formadas de lisofosfatidilcolina y ácido lisofosfatídico (LPA) bajo un pH neutro, induce una transición conformacional en el péptido hélice-Z que contiene una estructura secundaria en hoja- β hacia la estructura nativa α -hélice, de manera que la formación de las fibras amiloides se mantiene inhibida. En contraste, la incubación con ácido fosfatídico no cambia el perfil de la conformación- β . Cuando la carga electrostática en la superficie de micelas o vesículas se modula a través del uso de fosfolípidos y LPA, se registraron cambios mínimos en el contenido de estructura- β . Solamente mezclas con una carga neta positiva disminuyeron el porcentaje de estructura- β y la cantidad de fibras amiloides. Nuestros resultados sugieren que el grado de solvatación determinado por la presencia de grupos hidroxilo libres en lípidos como el LPA es una condición clave que puede modular la estructura secundaria y la consiguiente formación de fibras amiloides en el dominio C-terminal de CETP.

5.2 Introducción

La estructura tridimensional de la región C-terminal de CETP (aa 453-476) está integrada de una cadena- β (aa 453-462) y de la α -hélice anfipática (aa 465-476) nombrada hélice-X (Fig.1). Varios estudios han demostrado que un sitio crítico para el proceso de transferencia está determinado al dominio hélice-X de 12 residuos [1-3]. No obstante, mediante el uso del péptido hélice-Z que contiene la mutación D₄₇₀N nuestro grupo ha reportado que este dominio muestra cambios conformacionales en un microambiente no lipídico [4,5]. A su vez, estas condiciones originan la formación de un cluster hidrofóbico (⁴⁶⁷LLVNFLQ⁴⁷³) que favorece la presencia de una estructura secundaria- β , mecanismo acoplado a la formación de oligómeros y fibras de tipo amiloide [5].

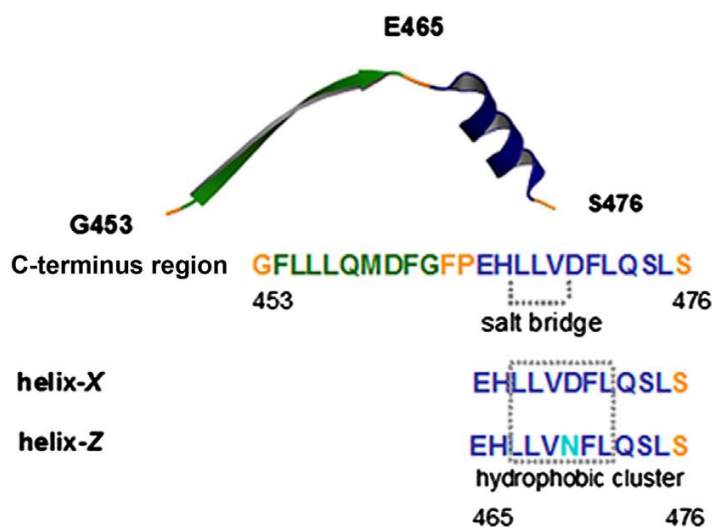


Fig.1. Representación estructural de la región C-terminal de CETP que muestra las secuencias de los péptidos hélice-X y hélice-Z. Se muestran el puente salino H₄₆₆-D₄₇₀ y el cluster hidrofóbico. La estructura se obtuvo del Protein Data Bank, código de acceso: 2obd.

Previamente, ha sido reportado que bajo condiciones específicas, moléculas de lípidos inducen cambios conformacionales en diversas proteínas precursoras de amiloides, además de la función clave que tienen en la formación y estabilización de las fibras [6-8]. Asimismo, la interacción entre las especies precursoras oligoméricas en

dominios específicos de la membrana celular es un evento primario que resulta en la aparición de los primeros efectos citotóxicos que pueden estar asociados con enfermedad [9,10]. En este caso, el papel de la composición lipídica sobre la interface hidrofílica/hidrofóbica debe ser crítico, como un sitio de reconocimiento que puede modular posibles cambios conformacionales en la estructura secundaria de las proteínas, lo que su vez podría modificar la formación de estructuras controladas por transiciones orden-desorden y desorden-orden [5-7,9,11]. A este respecto, hemos ampliado estos conceptos del desorden estructural en proteínas por medio de la publicación del libro “El concepto de enfermedad asociado a la conformación de proteínas”. En esta obra se abordan una serie de tópicos que se adentran en la búsqueda y estudio de las modificaciones en el plegamiento de las proteínas y que en nuestros días han empezado a ofrecer una explicación molecular a un importante número de enfermedades (Anexo IV).

Por otra parte, se ha descrito que moléculas lipídicas tales como el LPA, un fosfolípido derivado de la acción enzimática de varias fosfolipasas extracelulares a partir de moléculas precursoras como la lisofosfatidilcolina o el ácido fosfatídico (PA), pueden promover en la proteína β 2-microglobulina la formación de fibras amiloide *in vitro* [12,13]. Sin embargo, la vía por la que la enzima autotaxina particularmente produce una alta cantidad de LPA a partir de lisofosfatidilcolina, es todavía poco entendida [14,15].

En este trabajo, empleando a la hélice-Z como péptido modelo, hemos estudiado el papel de varios arreglos de lípidos como posibles moduladores de la estructura secundaria, y potencialmente sobre la formación de fibras amiloides.

A lo largo del presente capítulo se presentan una serie de experimentos que demuestran que el tratamiento de la hélice-Z con LPA y lisofosfatidilcolina (lyso-C₁₂PC), lípidos que pueden encontrarse en la superficie de las lipoproteínas, promueve un cambio estructural de una cadena- β hacia la estructura nativa α -hélice. La incubación de la hélice-Z con concentraciones de LPA por arriba de 2.5 mM inhibe completamente

la formación de fibras amiloide, de manera que las interacciones del péptido con interfaces hidrófilicas/hidrófobicas formadas por este lípido, deben retener los monómeros de péptidos en la superficie y por lo tanto, prevenir el auto-ensamblaje. Estas condiciones podrían permitir a la hélice-Z recuperar y mantener la conformación funcional α -hélice del dominio C-terminal de CETP, y por lo tanto mantener la función de la proteína.

5.3 Materiales y métodos

El colesterol, los ésteres de colesterol, el dipalmitoil ácido fosfatídico (PA), la dipalmitoil fosfatidiletanolamina (PE) y la dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC) se obtuvieron de Sigma-Aldrich. Los lípidos PC, 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo-1-glicerol (POPG), 1-lauroil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (lyso-C₁₂PC) y el 1-oleoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfato (LPA) se obtuvieron de Avanti Polar Lipids.

Síntesis y preparación de péptidos

La hélice-Z (⁴⁶⁵EHLLVNFLQSL^{S476}) y el péptido nativo hélice-X (⁴⁶⁵EHLLVDFLQSL^{S476}) derivados del C-terminal de CETP fueron sintetizados por GenScript, y disueltos en un amortiguador de carbonatos pH 9.5 (1 mg/mL). A partir de esta concentración, una dilución 1:5 fue realizada. Para evaluar la estructura a pH de 7.2 en diferentes ambientes de lípidos, se empleo un amortiguador de fosfatos. Bajo las mismas condiciones, el péptido control ⁴⁶⁰DFGFPEHL⁴⁶⁷ fue empleado. Las soluciones fueron filtradas a través de 0.22 μ m antes de realizar los experimentos. La pureza de los péptidos fue mayor al 98 %, confirmada por espectrometría de masas y HPLC.

La concentración de los péptidos fue determinada a través de la absorbancia del enlace peptídico a 205 nm. Muestras de péptidos a concentraciones de 200 μ g/mL fueron incubadas en diferentes preparaciones de lípidos por 12 h a 25°C antes de su

caracterización estructural, empleando DC, fluorescencia asociada a tioflavina T, espectroscopía del enlace peptídico y microscopía electrónica.

Espectroscopía de dicroísmo circular

Los espectros de DC fueron registrados en un espectropolarímetro Aviv62DS (AVIV instruments) a 25°C en un rango de 190-260 nm. Los experimentos fueron llevados a cabo a una concentración de 200 µg/mL de péptido en una celda de cuarzo de 0.1 cm, usando un tiempo promedio de integración de 2.5 s, e incrementos de 1 nm. Los resultados de DC fueron reportados en valores de elipticidad molar media (Θ , deg cm² dmol⁻¹) considerando la corrección realizada con las soluciones base.

Fluorescencia asociada a tioflavina T y espectroscopía del enlace peptídico

Empleando 180 µg/mL de péptido, la absorbancia se midió cada 1 nm usando un espectrofotómetro Perkin Elmer UV/Vis Lambda2S, en un intervalo de 200-240 nm. Los espectros se corrigieron considerando los espectros de las soluciones control. Adicionalmente, la estructura- β se caracterizó con ensayos de fluorescencia asociada a tioflavina T (ThT). Los espectros de emisión de fluorescencia se registraron a 25°C en un rango de 470-540 nm con una longitud de onda de excitación de 450 nm. Se utilizó una velocidad de barrido de 60 nm/min con un espectrofluorímetro Olis DM45. Las concentraciones de ThT y péptidos fueron 10 µM y 36 µM, respectivamente.

Preparación de micelas de lyso-C₁₂PC, LPA y PA

Las cantidades requeridas del lípido lyso-C₁₂PC disuelto en cloroformo fueron colocadas bajo un flujo suave de N₂ por 4 h. La evaporación completa del solvente se alcanzó con un tratamiento adicional por 22 h en un equipo de vacío SpeedVac. Posteriormente, las muestras fueron resuspendidas en un amortiguador de fosfatos pH 6.8 a 37°C (50 mM), se mantuvieron por 2 h a 25°C y fueron centrifugadas a 13,000 rpm por 10 min.

Por otra parte, las muestras de ácido lisofosfatídico (LPA) se colocaron bajo un flujo suave de N₂ por 6 h, y 12 h adicionales en el equipo de vacío. Las muestras fueron resuspendidas en amortiguador de fosfatos para ser procesadas a través de 4 ciclos de congelamiento en N₂ líquido, y descongelamiento a 37°C. Las muestras se dejaron equilibrar por 2 h y fueron centrifugadas a 13,000 rpm por 10 min. Bajo las mismas condiciones experimentales, micelas de ácido fosfatídico (PA) fueron preparadas con una etapa adicional de sonicación por 4 ciclos por 10 min.

Preparación de micelas de fosfolípidos y LPA

Los lípidos PC y LPA fueron mezclados en CHCl₃ y secados por 6 h bajo un flujo de N₂, con un tratamiento adicional en el equipo de vacío por 22 h. Las mezclas de lípidos fueron preparadas con una relación molar de PC 3.06 mM y LPA 0.92 mM. Después del secado, las mezclas fueron resuspendidas en un amortiguador pH 6.8 y posteriormente sonicadas por 4 ciclos. Las muestras se mantuvieron equilibradas por 2 h a 25°C y al final fueron centrifugadas a 13,000 rpm por 10 min. Empleando la misma metodología, se prepararon micelas compuestas de DPPC/LPA y PE/LPA. De igual forma, micelas con una carga negativa fueron preparadas con la adición de LPA, bajo una relación de 75 % de POPC y 25 % de POPG.

Microscopía electrónica

Las muestras de péptido bajo las diferentes condiciones evaluadas se procesaron a través de la técnica de tinción negativa y fueron visualizadas usando MET. Alícuotas de 10 µL de las soluciones se colocaron sobre rejillas de cobre recubiertas con una capa de carbón (400 pozos) y se contrastaron con una solución 2 % de acetato de uranilo. Después de una incubación por 5 min a 25°C fueron secadas por 20 min. Las imágenes de MET fueron obtenidas a través de un microscopio JEOL JEM-1200EX11, a 70 kV y con aumentos de 60,000x.

5.4 Resultados y discusión

Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que el péptido hélice-Z presenta la formación de una estructura secundaria de tipo- β dependiente del pH y de la concentración de péptido [5]. Condiciones como la fuerza iónica no modificaron el contenido de la estructura- β , y sólo temperaturas por arriba de 70°C promueven una disminución en el contenido de estructura secundaria [5]. En este estudio, se evaluó el efecto de varios arreglos de lípidos sobre la estructura de la hélice-Z a un pH de 7.2. Específicamente, se realizó una serie de experimentos a través de cambios en las características regionales de los lípidos, tales como el tamaño de la cabeza polar, la longitud de la cadena acilo, la carga electrostática y el grado de solvatación, condiciones que podrían modificar la estructura secundaria de la hélice-Z.

El tratamiento con concentraciones crecientes de lyso-C₁₂PC (0.01-40.0 mM) mostró que concentraciones de lípido por debajo de 5 mM permite a la hélice-Z mantener una conformación- β cuando es monitoreada a través de DC (Fig. 2A). La incubación con 1 mM de lyso-C₁₂PC, concentración cercana a su cmc (0.9 mM), induce un incremento en los valores que corresponden a la estructura- β (Fig. 2A y B). Bajo esta condición, las interacciones de la hélice-Z y el lyso-C₁₂PC en el medio acuoso deben llevarse a cabo en un equilibrio dinámico entre monómeros de lípidos, así como entre las micelas formadas.

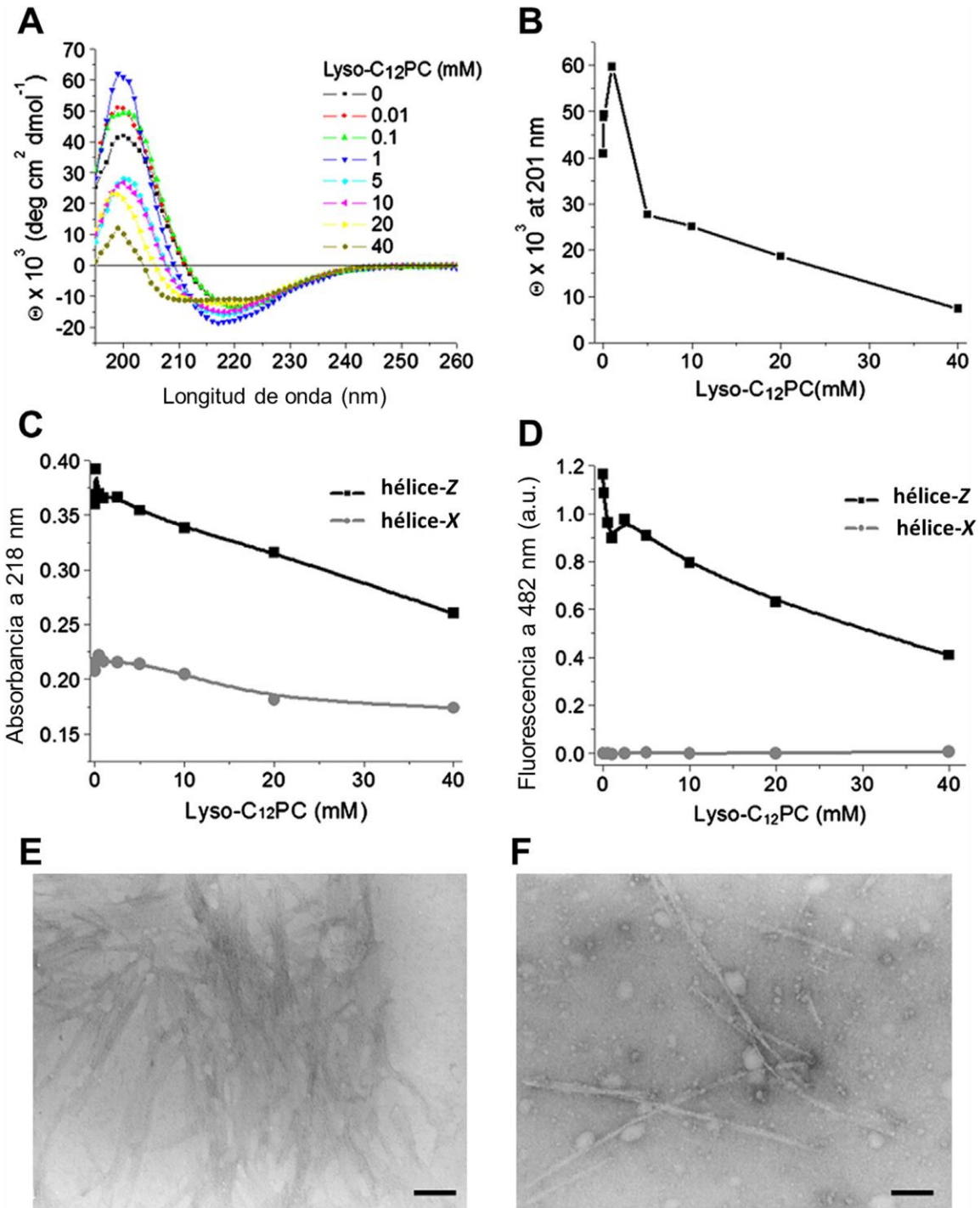


Fig. 2. Efecto de la lisofosfatidilcolina sobre la estructura de la hélice-Z. **A)** Espectros de DC obtenidos bajo el tratamiento con concentraciones crecientes de lyso-C₁₂PC. **B)** Valores de elipticidad molar media a 201 nm. **C)** Bajo las mismas condiciones se registró la absorbancia a 218 nm. **D)** Espectros de emisión a 482 nm de fluorescencia asociada a ThT. El péptido hélice-X nativo se usó como control. **E)** Fibras de tipo amiloide formadas por la hélice-Z. **F)** La hélice-Z incubada con vesículas de lyso-C₁₂PC (10 mM). Las barras corresponden a 100 nm.

En este sentido, se ha reportado que moléculas con una estructura similar a la lyso-C₁₂PC desencadenan el fenómeno de agregación en proteínas no amiloidogénicas bajo concentraciones equivalentes a las usadas en este estudio [16]. En nuestras condiciones, concentraciones de lyso-C₁₂PC cercanas a 10 mM indujeron un punto de transición entre la estructura en hoja-β y la formación de la estructura α-helicoidal. Este cambio fue seguido a través de la evaluación de los espectros de DC de la conformación en hoja-β a 201 nm ($\Theta_{201 \text{ nm}}$) (Fig. 2B). También se estudió este fenómeno siguiendo el cambio en la absorbancia del enlace peptídico a 218 nm (Fig. 2C) y por medio de la fluorescencia asociada a ThT (Fig. 2D). Bajo el tratamiento con lyso-C₁₂PC (10 mM), aún se identificaron estructuras fibrilares en cantidades menores pero más extendidas con respecto a las muestras de la hélice-Z que no se incubaron con lípidos (Fig. 2E y F). En concentraciones más altas de lyso-C₁₂PC (20 y 40 mM), aunque se detectó una señal residual de estructura-β después de seguir la absorbancia del enlace peptídico y la fluorescencia asociada a ThT, los espectros de DC mostraron la formación de estructuras α-hélices bien definidas.

En otra serie de experimentos, considerando que las propiedades hidrófobas del microambiente son condiciones clave que favorecen cambios estructurales en dominios específicos de proteínas de unión a lípidos, se evaluaron varias moléculas de lípidos con estructuras similares a la lyso-C₁₂PC. Usando un rango de concentración de 0.1-10 mM de LPA, lípido con una cabeza polar reducida cercana a las cadenas acilo, una serie de experimentos se llevaron a cabo estudiando los cambios conformacionales de la estructura-β hacia una α-hélice. Los espectros obtenidos mostraron un punto isodicroico cercano a 215 nm asociado con la presencia de dos estados conformacionales (Fig. 3A).

Los experimentos de DC muestran que la transición estructural de hoja β hacia α, también fue identificada mediante el gráfico de la señal de $\Theta_{201 \text{ nm}}$, en donde se encontró que la incubación con concentraciones de LPA por arriba de 1 mM induce una disminución drástica en los valores de DC asociados con la pérdida de estructura-β (Fig.

3B). De forma paralela, los cambios conformacionales fueron seguidos a través de la absorbancia del enlaces peptídico a 218 nm (Fig. 3C) y por medio de las mediciones de fluorescencia asociada a ThT (Fig. 3D).

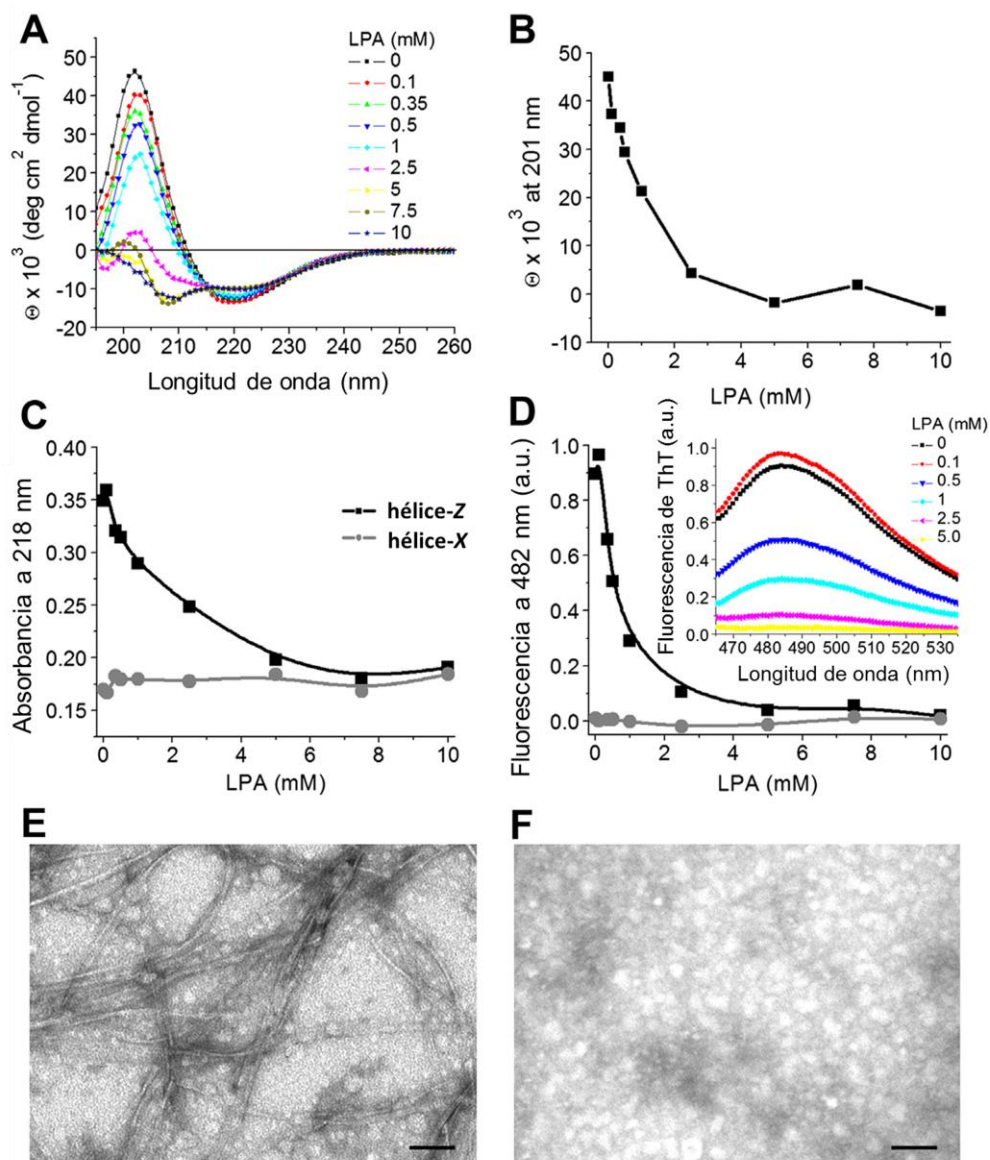


Fig. 3. El LPA previene la formación de fibras amiloides en la hélice-Z. **A)** Espectros de DC de la hélice-Z incubada con concentraciones crecientes de LPA. **B)** Valores de elipticidad molar media a 201 nm. **C)** Valores de absorbancia a 218 nm. **D)** Fluorescencia asociada a ThT a 482 nm. El péptido nativo fue usado como control. El inserto muestra los espectros de emisión de la hélice-Z en diferentes concentraciones de LPA. **E)** Fibras amiloides formadas por la hélice-Z. **F)** Efecto del tratamiento con LPA sobre la formación de fibras. La barra corresponde a 100 nm.

Los datos indican que el tratamiento con LPA induce una transición estructural bien definida en la estructura secundaria, de una hoja- β hacia una estructura α -helicoidal en concentraciones superiores a la cmc. De hecho, después del tratamiento con 2.5 mM de LPA, la fluorescencia asociada a ThT fue suprimida (Inserto Fig. 3D), indicando una pérdida completa del contenido de estructura- β . Asimismo, no se encontraron estructuras fibrilares en las muestras analizadas de LPA por debajo de 10 mM, procesadas a través de MET (Fig. 3F). Nuestros resultados sugieren que los cambios conformacionales en la estructura secundaria dependientes del LPA, están asociados con un proceso cooperativo, en donde la hélice-Z recupera los niveles de estructura α -helicoidal de forma similar a los registrados cuando el péptido nativo hélice-X es estudiado (datos no mostrados). Sin embargo, esto no podría considerarse como un fenómeno general en lípidos con grupos hidroxilo libres en la cabeza polar. En las concentraciones más altas de lyso- C_{12} PC (20 y 40 mM), la señal de fluorescencia asociada a ThT no fue completamente suprimida, de manera que la incubación con lyso- C_{12} PC puede estar asociada con una transición parcial hacia la formación de α -hélices.

El tamaño de la cabeza polar y la presencia de un grupo hidroxilo libre en la posición sn2 del esqueleto de glicerol, propiedades que pueden modificar el grado de solvatación en la interface hidrofílica/hidrofóbica [7], deben tener un papel clave en los mecanismos que modulan la formación de fibras amiloides dependientes de lípidos [7,9]. En este caso, los componentes hidrófilicos de los fosfolípidos, tales como el grupo hidroxilo libre en el LPA, pueden modificar la posición y el arreglo de los ensamblajes hidrófobicos en relación a la interface [17]. De manera que hemos evaluado esta posibilidad a través del tratamiento con concentraciones crecientes de PA, una molécula lipídica con dos cadenas acilo en el esqueleto de glicerol, condiciones que no deben promover el cambio conformacional de la estructura- β hacia la α -hélice. Esta propuesta fue corroborada usando un intervalo de concentraciones de 0.1-5 mM de PA, y a través del empleo de técnicas espectroscópicas se mantuvo la presencia de la

estructura- β , así como la propiedad de formación de fibras amiloides en el péptido hélice-Z (datos no mostrados).

Considerando que la carga electrostática sobre las superficies de los lípidos es un factor que podría modular la estructura secundaria de la hélice-Z, se estudió el efecto de una serie de mezclas de fosfolípidos con LPA (76 %/24 %) (Fig. 4). El tratamiento del péptido con micelas formadas de POPC/POPG y LPA con una carga electrostática negativa sobre la superficie no modificó el perfil de la estructura secundaria- β , caracterización que se realizó a través de DC y fluorescencia asociada a ThT (Fig. 4A y B). Esta condición se mantuvo durante todo el intervalo de concentración estudiada de esta mezcla (0.1-2.4 mM), registrándose la formación de micelas en las concentraciones más altas (datos no mostrados).

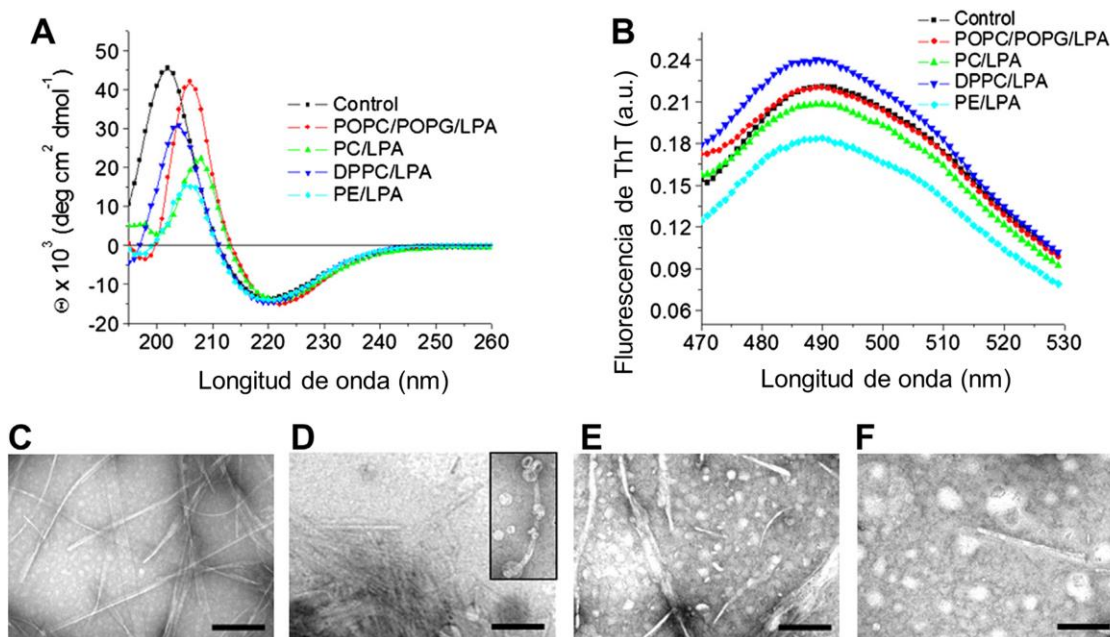


Fig. 4. Efecto de la carga electrostática de los lípidos sobre la estructura de la hélice-Z. **A)** Espectros de DC de la hélice-Z incubada con micelas de lípidos de diferente composición. **B)** Espectros de emisión de fluorescencia asociada a ThT. Microscopía electrónica de la hélice-Z sin tratamiento con lípidos (**C**), y con micelas compuestas de PC/LPA (**D**), DPPC/LPA (**E**) y con PE/LPA (**F**). Las barras corresponden a 200 nm.

Cuando la hélice-Z se incubó con vesículas con una carga electrostática neutra compuestas únicamente de POPC (1.23 mM) y LPA (0.37 mM), los espectros de DC y los valores de emisión de fluorescencia fueron similares a los valores de las muestras control sin la adición de lípidos (Fig. 4A y B). Una respuesta similar se obtuvo cuando se estudiaron micelas neutras formadas por fosfatidilcolina, una condición en la que se mantiene la formación de fibras amiloides bien definidas (Fig. 4C y D). Considerando que se utilizó un tiempo de incubación prolongado (24 h), se redujo la presencia de estructuras oligoméricas en las muestras [5]. No obstante, en estas muestras fue posible identificar algunas fibras amiloides situadas sobre la superficie de las micelas de lípido (Inserto Fig. 4D), una condición que sugiere la presencia de interacciones en la superficie de las micelas sin que ocurra un cambio estructural en la hélice-Z.

El tratamiento con concentraciones crecientes de preparaciones de lípidos que contienen mezclas de PC/ésteres de colesterol usadas extensivamente en un trabajo anterior empleando a la CETP [18], no modula los cambios estructurales descritos anteriormente con el LPA y la lyso-C₁₂PC, y solamente se registró una ligera disminución en el contenido de la estructura-β (datos no mostrados).

Bajo las mismas condiciones, la incubación con vesículas neutras formadas de DPPC y LPA mantiene la conformación en hoja-β en la hélice-Z. Sin embargo, en este caso se registró un aumento en el espectro de fluorescencia asociada a ThT, condición que está relacionada con la presencia de una concentración más alta de fibras, mostrada a través del procesamiento de las muestras por MET. Se registraron varias características relacionadas específicamente con la morfología de estas fibras, como un patrón altamente heterogéneo (Fig.4E).

El tratamiento con micelas compuestas de PE y LPA, con una carga electrostática positiva en la superficie y un grupo de cabeza polar reducido, induce una disminución moderada en el contenido de la estructura-β de la hélice-Z (Fig. 4A y B). De la misma forma, se registraron cantidades más bajas de fibras amiloide con respecto a los tratamientos previos de lípidos (Fig. 4F). Bajo nuestras condiciones

experimentales, en un pH neutro la hélice-Z mantiene una carga neta negativa (-1), de tal manera que estos resultados podrían estar asociados con una capacidad de unión electrostática menor en la superficie de las vesículas con una carga positiva. De forma interesante, cuando se evaluó a la hélice-X, el dominio nativo C-terminal de CETP en un estado desordenado, bajo la presencia de vesículas compuestas de PE/LPA se registraron los niveles más altos de estructura α -hélice.

El clúster hidrofóbico en el dominio C-terminal de CETP ⁴⁶⁷LLVNFLQ⁴⁷³ originado por la mutación D₄₇₀N, comparte características similares con los motivos estructurales hidrofóbicos contenidos en los *steric zippers*, los cuales han sido descritos forman parte de la estructura molecular de las fibras amiloides [19,20]. En este sentido, la mutación D₄₇₀N minimiza las repulsiones electrostáticas entre péptidos monoméricos, promoviendo la formación de puentes de hidrógeno en el esqueleto y disparando la formación de la hoja- β con la consiguiente formación de fibras en la hélice-Z [5]. Estos fenómenos están restringidos al extremo C-terminal (residuos 465-476), ya que las secuencias de péptidos que corresponden a ⁴⁶⁰DFGFPEHL⁴⁶⁷ no muestran la formación de la hoja- β , e incluso bajo la presencia de lípidos, el péptido permanece en un estado desordenado (datos no mostrados).

La inhibición de la formación de fibras y la estabilización de una estructura α -helicoidal en la hélice-Z puede estar asociada directamente con las propiedades fisicoquímicas del LPA. La presencia de un grupo hidroxilo libre y un grupo de cabeza polar reducido puede facilitar el reconocimiento molecular sobre la hélice-Z, lo que permite la interacción de los péptidos monoméricos en la superficie de las micelas. De manera que la nucleación y el apilamiento de los péptidos, fenómenos que conducen a la agregación y finalmente a la formación de fibras, se encuentran suprimidos. En este sentido, se ha reportado que la estabilidad del plegamiento nativo en péptidos y proteínas está determinada principalmente por interacciones hidrofóbicas entre las cadenas laterales, mientras que la estabilidad de las fibras amiloides es dependiente en mayor medida de puentes de hidrógeno intramoleculares en la cadena principal [21].

Por otra parte, un grupo importante de eventos que ocurren en la superficie de los lípidos están influenciadas por las redes de puentes de hidrógeno [22], de tal manera que la unión lípido/hélice-Z en la superficie de las micelas o lipoproteínas podría implicar la liberación de moléculas de agua altamente ordenada situadas en las primeras capas de hidratación, con la consiguiente reorganización de puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. De manera que los cambios conformacionales y la modulación de la estructura secundaria de los péptidos requieren de condiciones clave asociados al microambiente, siendo parámetros importantes el grado de solvatación y el tamaño de la cabeza polar de los lípidos. Nuestros resultados muestran un papel regulatorio para el LPA mediante la modulación de los mecanismos que mantienen al dominio C-terminal de CETP en una conformación funcional directamente asociada a la presencia de una estructura α -helicoidal en este dominio.

Con fundamento en los resultados presentados, se publicó el artículo: “Amyloid fibril formation of peptides derived from the C-terminus of CETP modulated by lipids” (Anexo VI). Con la finalidad de ampliar nuestra propuesta de trabajo asociada con cambios de estructura secundaria modulados por el microambiente de lípidos en dominios de proteínas que tienen la capacidad de interactuar con lípidos, se publicó el artículo: “Microenvironmentally controlled secondary structure motifs of apolipoprotein A-I derived peptides” (Anexo X). En este sentido, la colaboración estuvo relacionada con el desarrollo de la estrategia experimental y la discusión de resultados. Los datos obtenidos sugieren que las propiedades fisicoquímicas de dominios clave en la apolipoproteína A-I pueden estar asociadas con transiciones desorden-orden que a su vez mantienen el delicado equilibrio entre la conformación nativa y anómala, y por tanto, podrían controlar la propensión a estar relacionadas en procesos patológicos.

5.5 Referencias

- [1] Alonso AL, Zentella-Dehesa A, Mas-Oliva J (2003). Characterization of a naturally occurring new version of the cholesterol ester transfer protein (CETP) from small intestine. *Mol Cell Biochem.* 245:173-182.
- [2] Wang S, Kussie P, Deng L, Tall A (1995). Defective binding of neutral lipids by a carboxyl-terminal deletion mutant of cholesteryl ester transfer protein. Evidence for a carboxyl-terminal cholesteryl ester binding site essential for neutral lipid transfer activity. *J Biol Chem.* 270:612-618.
- [3] Wang S, Wang X, Deng L, Rassart E, Milne RW, Tall AR (1993). Point mutagenesis of carboxyl-terminal amino acids of cholesteryl ester transfer protein. Opposite faces of an amphipathic helix important for cholesteryl ester transfer or for binding neutralizing antibody. *J Biol Chem.* 268:1955-1959.
- [4] Bolaños-García VM, Soriano-García M, Mas-Oliva J (1998). Stability of the C-terminal peptide of CETP mediated through an (i, i + 4) array. *Biochim Biophys Acta* 1384:7-15.
- [5] García-González V, Mas-Oliva J (2011). Amyloidogenic Properties of a D/N Mutated 12 Amino Acid Fragment of the C-Terminal Domain of the Cholesteryl-Ester Transfer Protein (CETP). *Int J Mol Sci.* 12:2019-2035.
- [6] Andreola A, Bellotti V, Giorgetti S, Mangione P, Obici L, Stoppini M, Torres J, Monzani E, Merlini G, Sunde M (2003). Conformational switching and fibrillogenesis in the amyloidogenic fragment of apolipoprotein a-I. *J Biol Chem.* 278:2444-2451.
- [7] Mendoza-Espinosa P, Moreno A, Castillo R, Mas-Oliva J (2008). Lipid dependant disorder-to-order conformational transitions in apolipoprotein CI derived peptides. *Biochem Biophys Res Commun.* 365:8-15.
- [8] Sheikh AM, Nagai A (2011). Lysophosphatidylcholine modulates fibril formation of amyloid beta peptide. *FEBS J.* 278:634-642.
- [9] Mendoza-Espinosa P, García-González V, Moreno A, Castillo R, Mas-Oliva J (2009). Disorder-to-order conformational transitions in protein structure and its relationship to disease. *Mol Cell Biochem.* 330:105-120.
- [10] Evangelisti E, Cecchi C, Cascella R, Sgromo C, Becatti M, Dobson CM, Chiti F, Stefani M (2012). Membrane lipid composition and its physicochemical properties define cell vulnerability to aberrant protein oligomers. *J Cell Sci.* 125:2416-2427.
- [11] García-González VG, Mas-Oliva J. El Concepto de Enfermedad Asociado a la Conformación de Proteínas, first ed., Universidad Nacional Autónoma de México and El Manual Moderno, Mexico, 2012.
- [12] Ookoshi T, Hasegawa K, Ohhashi Y, Kimura H, Takahashi N, Yoshida H, Miyazaki R, Goto Y, Naiki H (2008). Lysophospholipids induce the nucleation and extension of

beta2-microglobulin-related amyloid fibrils at a neutral pH. *Nephrol Dial Transplant.* 23:3247-3255.

[13] Pál-Gábor H, Gombos L, Micsonai A, Kovács E, Petrik E, Kovács J, Gráf L, Fidy J, Naiki H, Goto Y, Liliom K, Kardos J (2009). Mechanism of lysophosphatidic acid-induced amyloid fibril formation of beta(2)-microglobulin in vitro under physiological conditions. *Biochemistry* 48:5689-5699.

[14] Nakanaga K, Hama K, Aoki J (2010). Autotaxin--an LPA producing enzyme with diverse functions. *J Biochem.* 148:13-24.

[15] Okudaira S, Yukiura H, Aoki J (2010). Biological roles of lysophosphatidic acid signaling through its production by autotaxin. *Biochimie* 92:698-706.

[16] Yamamoto S, Hasegawa K, Yamaguchi I, Tsutsumi S, Kardos J, Goto Y, Gejyo F, Naiki H (2004). Low concentrations of sodium dodecyl sulfate induce the extension of beta 2-microglobulin-related amyloid fibrils at a neutral pH. *Biochemistry* 43:11075-11082.

[17] Chandler D. (2005) Interfaces and the driving force of hydrophobic assembly. *Nature* 437:640-647.

[18] García-González V, Gutiérrez-Quintanar N, Mendoza-Espinosa P, Brocos P, Piñeiro A, Mas-Oliva J (2014). Key structural arrangements at the C-terminus domain of CETP suggest a potential mechanism for lipid-transfer activity. *J Struct Biol.* 186:19-27.

[19] Sawaya MR, Sambashivan S, Nelson R, Ivanova MI, Sievers SA, Apostol MI, Thompson MJ, Balbirnie M, Wiltzius JJ, McFarlane HT, Madsen AØ, Riekel C, Eisenberg D (2007). Atomic structures of amyloid cross-beta spines reveal varied steric zippers. *Nature* 447:453-457.

[20] Sievers SA, Karanicolas J, Chang HW, Zhao A, Jiang L, Zirafi O, Stevens JT, Münch J, Baker D, Eisenberg D (2011). Structure-based design of non-natural amino-acid inhibitors of amyloid fibril formation. *Nature* 475:96-100.

[21] Fitzpatrick AW, Knowles TP, Waudby CA, Vendruscolo M, Dobson CM (2011). Inversion of the balance between hydrophobic and hydrogen bonding interactions in protein folding and aggregation. *PLoS Comput Biol.* 7:e1002169.

[22] Jensen MØ, Mouritsen OG, Peters GH (2004). The hydrophobic effect: molecular dynamics simulations of water confined between extended hydrophobic and hydrophilic surfaces. *J Chem Phys.* 120:9729-9744.

6. La función de unión a lipopolisacáridos está determinada por el dominio C-terminal de CETPI

6.1 Resumen

El dominio clave para la función de CETP está situado en el C-terminal, sin embargo nuestro grupo de trabajo ha demostrado que este dominio puede presentar transiciones de estructura secundaria dependientes de lípidos. En ese sentido, hemos descrito una nueva isoforma de CETP expresada solamente en el intestino delgado e identificada en el plasma. La isoforma CETPI no tiene la estructura α -hélice en el dominio C-terminal, y en su lugar está presente una secuencia con un alto contenido en prolinas y residuos con carga positiva, características que promueven una estructura desordenada, la cual no se modula por lípidos. En este trabajo se ha encontrado que la expresión de CETPI en cultivos celulares de intestino delgado responde al estímulo con lipopolisacáridos (LPS), y la potencial función está relacionada con la unión a LPS. A través del uso de péptidos derivados del dominio C-terminal de CETPI se han caracterizado los mecanismos de unión a LPS, función que está determinada por interacciones electrostáticas en la superficie, abarcando varios serotipos de LPS. Asimismo, las interacciones peptídicas en la interface del lípido A promueven un rearrreglo en la conformación de los LPS. El tratamiento específico con un péptido derivado de los últimos 18 residuos (péptido VSAK) protege de los efectos citotóxicos inducidos por los LPS en macrófagos, a través del bloqueo de la unión de los LPS a la superficie celular, condición que reduce la internalización de los LPS, y en consecuencia los fenómenos citotóxicos asociados al estrés oxidativo. Ampliando la caracterización a un modelo de choque séptico en conejos, se registró un fenómeno de protección sutil bajo el tratamiento con el péptido VSAK. Considerando la expresión natural de CETPI, el uso del dominio C-terminal puede representar una estrategia terapéutica óptima para el tratamiento del choque séptico.

6.2 Introducción

La isoforma CETPI se expresa solamente en el intestino delgado y es identificada en el plasma [1]. A diferencia de la CETP, la isoforma CETPI no presenta el exón 16, y 54 bases contenidas en el intrón 15 forman parte del nuevo ARNm reemplazando los 24 residuos del C-terminal presentes en CETP por una secuencia de 18 residuos con un alto contenido de prolinas y residuos con carga positiva [1], condiciones que favorecen una disminución en la transferencia de lípidos neutros.

El análisis de la estructura tridimensional ha permitido la identificación de la proteína bactericida/incrementadora de permeabilidad (BPI), la cual presenta la propiedad de unión a LPS [2]. La proteína BPI comparte los elementos estructurales más importantes y un alto nivel de similitud a nivel de estructura tridimensional con CETP, a pesar de que tienen una homología baja en la secuencia primaria (16%) (datos no mostrados). De forma interesante, en la superficie cóncava, la nueva isoforma CETPI y la proteína BPI no tienen el dominio clave α -helicoidal situado en el extremo C-terminal, y en su lugar las dos proteínas tienen una alta distribución de residuos con carga positiva, lo cual es una característica importante asociada con una potencial función de unión a LPS. No obstante, cuando se realizó un análisis de alineamiento con respecto a BPI, LBP y CETP, solamente en los últimos 18 residuos del C-terminal de CETPI se presenta una distribución regular de residuos cargados positivamente.

De forma interesante, el C-terminal de CETPI comparte algunas características con un grupo de proteínas y péptidos con propiedades catiónicas que presentan afinidad por la superficie microbiana cargada negativamente y por lo tanto por los LPS, los cuales se han utilizado como moléculas amortiguadoras o bloqueadoras de la acción tóxica de estos lípidos sobre la membrana plasmática de diversos tipos celulares. En este sentido, se ha redactado un capítulo en el libro conmemorativo de los 150 años de la fundación de la Academia Nacional de Medicina de México, en el cual se realiza una revisión actualizada sobre el uso de proteínas y péptidos que presentan la capacidad de

interaccionar con los LPS y su potencial empleo en el control del choque séptico [Anexo VII].

Los LPS representan un componente esencial de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas y son un requisito para su viabilidad. Estos glicolípidos fosforilados, son únicos de cada especie, pero en general consisten de cuatro componentes: el lípido A, el núcleo interno, el núcleo externo y el antígeno-O. Sin embargo, la mayor parte de las variantes entre LPS residen en el lípido A, la parte hidrófoba que mantiene anclado el LPS a la capa exterior de la membrana. El lípido A también se considera el elemento más importante, ya que representa la fracción tóxica. En experimentos en los que el lípido A es desfosforilado o deacetilado, el efecto tóxico de la molécula se mantiene reducido [2].

En el torrente sanguíneo, cuando el lípido A se encuentra expuesto, la respuesta inmune es activada y una serie de citocinas mediadoras de la inflamación son liberadas a la circulación. La pérdida de regulación de la respuesta inmune después de una infección puede provocar una inflamación sistémica exacerbada, lo que lleva a la patogénesis hemodinámica y a la presencia de alteraciones metabólicas, cuyas consecuencias pueden ser el desarrollo de choque séptico y fallas multiorgánicas. En este sentido, el choque séptico se ha definido como una respuesta inflamatoria sistémica con hipotensión refractaria durante un cuadro infeccioso, y es una de las principales causas de muerte en las unidades de cuidados intensivos de todo el mundo [3,4].

Tomando en cuenta que los LPS están cargados negativamente debido a los grupos carboxilo y fosfato, la BPI así como péptidos catiónicos y anfifílicos pueden interaccionar con el lípido A y con la región de los carbohidratos en los LPS [5]. En base a las similitudes en la estructura tridimensional entre CETPI y BPI, y considerando que la expresión CETPI es estimulada por LPS en células de intestino delgado, se propone que la nueva proteína descubierta en nuestro laboratorio podría tener la capacidad de unión a LPS.

Por otro lado, la CETP es principalmente sintetizada en el hígado, en donde el dominio C-terminal nativo (E₄₆₅-S₄₇₆) estructurada como una α -hélice anfipática corresponde con una región clave para la actividad de transferencia de lípidos [6-8]. Nuestros resultados sugieren que el mecanismo de transferencia puede estar directamente conectado con la formación de un sistema micelar de lípidos, asignando al dominio C-terminal la propiedad de llevar a cabo el ordenamiento de lípidos solamente cuando la estructura α -hélice es formada bajo transiciones desorden-orden [9].

En este sentido, hemos demostrado que el dominio C-terminal de la CETP puede presentar cambios conformacionales en un ambiente libre de lípidos y cuando la mutación D₄₇₀N es introducida en esta secuencia. Estas condiciones promueven la formación de una estructura- β y la posterior formación de fibras de tipo amiloide [10]. Nuestros experimentos han permitido proponer que un delicado equilibrio entre la estructura secundaria altamente dinámica del dominio C-terminal, parámetros fisicoquímicos como la carga neta, y el grado de solvatación en la interface lipídica, definen el tipo de estructura secundaria [11]. Modificaciones en este balance promueven alteraciones en la estructura secundaria, y como consecuencia la función podría estar modificada.

Considerando nuestra propuesta, a través de la experimentación con péptidos derivados del dominio C-terminal de CETPI, se descubrió que la función de unión a LPS reside en este dominio de la proteína. En este sentido, un péptido nombrado VSAK presenta las características fisicoquímicas óptimas para el bloqueo de los LPS, y tomando en cuenta que se deriva del C-terminal de CETPI, que a su vez es sintetizada en el intestino delgado, este descubrimiento podría impulsar el desarrollo de un tratamiento nuevo y eficaz contra la inhibición de la actividad de los LPS.

6.3 Materiales y métodos

Materiales

Los lípidos PC, LPA y lyso-C₁₂PC fueron obtenidos de Avanti Polar Lipids. El colesterol, la molécula MTT, los serotipos de LPS (O111:B4, O26:B6, O55:B5) y la Polimixina B (PmB) fueron proporcionados por Sigma-Aldrich. El extracto polar de lípidos de *E. coli* (ATCC 11303) compuesto de fosfatidiletanolamina 67 %, fosfatidilglicerol 23.2 % y cardiolipina 9.8 % fue de Avanti Polar Lipids. Los LPS fluorescentes de *E.coli* LPS BODIPY FL, LPS Alexa Fluor 488, LPS Alexa Fluor 488 de *Salmonella minnesota*, así como la sonda 6-carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato fueron obtenidos de Invitrogen. Los reactivos para cultivo celular fueron de Gibco-Invitrogen, y el material de plástico fue de Corning. Los anticuerpos usados en los ensayos de inmunoprecipitación fueron de Santa Cruz Biotechnology. La fosfatasa alcalina fue obtenida de New England BioLabs.

Cultivo celular

Cultivos de células epiteliales de intestino delgado FHs74Int (ATCC) fueron mantenidos en medio Hybri-Care suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 30 ng/mL de factor de crecimiento epidermal. Las células Caco-2 de colon (ATCC) se mantuvieron en medio MEM con 20 % de SFB. Células RAW 264.7 (ATCC, macrófagos) se cultivaron en medio RPMI 1640 con 10 % de SFB. Las células HepG2 (ATCC) fueron cultivadas en medio MEM con 10 % de SFB y piruvato de sodio 1 mM. A los medios de cultivo se les adicionó penicilina (50 U/mL) y estreptomina (50 µg/mL).

Partículas formadas de fosfatidilcolina/colesterol. Lípidos bacterianos y LPS

Las partículas de PC y colesterol fueron preparadas con una relación molar de PC de 2 mM y 0.1 mM de colesterol (20:1). Los lípidos se mezclaron en cloroformo y fueron secados por 2 h bajo un flujo suave de N₂, con un período adicional de 12 h en un concentrador Speed Vac (Savant). Después del secado, los lípidos se resuspendieron

en PBS y posteriormente fueron sonicados con 4 ciclos de 10 min (15 s/30 s) en un baño de hielo bajo un flujo suave de N₂. Las muestras se dejaron equilibrar por 2 h y después se centrifugaron a 13000 rpm por 10 min. Para el extracto polar de lípidos de *E. coli* (2 mg/mL), se empleó la misma metodología con 5 ciclos de sonicación. Los LPS se disolvieron en H₂O ultrapura (1 mg/mL), y se sonicaron en un baño de agua por 10 min.

Micelas formadas de lisofosfatidilcolina y ácido lisofosfatídico

Las micelas fueron preparadas siguiendo la misma metodología que en la referencia [11].

Anticuerpos de CETP y CETPI

El anticuerpo para la detección de β -actina fue obtenido de Santa Cruz Biotechnology, y el anticuerpo monoclonal contra CETP de Affinity Bioreagents. Asimismo, los anticuerpos que reconocen específicamente los respectivos dominios C-terminal de la CETP y CETPI se obtuvieron a partir de la síntesis de péptidos correspondientes a los 11 residuos del extremo C-terminal. Para el acoplamiento con la Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH), los péptidos incluyen una cisteína en el extremo amino. Los péptidos acoplados a KLH se usaron para la producción de los anticuerpos anti-CETP IgY y el anti-CETPI IgY en gallinas blancas Leghorn, utilizando un protocolo estándar de 63 días (Alpha Diagnostic International). Los protocolos utilizados en este documento están basados en varias patentes desarrolladas por nuestro grupo de trabajo [12-15].

Ensayo de inmunodetección tipo WB

Con una confluencia del 90%, las células Caco-2, FHs74Int y HepG2 se trataron bajo diferentes condiciones de lípidos por 16 h. Posteriormente, las células se lisaron por 45 min a 4°C, y las muestras fueron procesadas de acuerdo a protocolos utilizados en un trabajo previo [5]. Las membranas de PVDF se bloquearon toda la noche a 4°C

en un amortiguador TBS, 0.1 % de Tween-20, y leche al 5%. Para la detección de CETP, se utilizó una dilución de anticuerpo monoclonal primario 1:400, y para β -actina 1:500. Las membranas se incubaron por 1 h a 37°C. Después de los lavados, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios (1:5000) por 1 h a 37°C. Posteriormente, las membranas se lavaron y la actividad de peroxidasa de rábano se detectó con el kit Western Immobilon (Millipore).

De la misma forma, para la detección de CETP y CETPI, se usaron los anticuerpos primarios anti-CETP IgY y anti-CETPI IgY siguiendo los protocolos establecidos en las patentes [12-15].

Ensayos de viabilidad celular

La viabilidad celular en los diferentes tratamientos se evaluó mediante el ensayo de reducción del MTT, con base en trabajos previos [10].

Síntesis de péptidos y preparación

Considerando la secuencia de aminoácidos y las propiedades fisicoquímicas del C-terminal de CETPI, se sintetizaron varios péptidos: el péptido VSAK que corresponde a los últimos 18 residuos (V₄₇₄-P₄₉₁), el péptido ARS (A₄₈₁-P₄₉₁) específico de los últimos 11 residuos, y el péptido INPE (I₄₆₅-P₄₉₁) correspondiente a los últimos 27 residuos (Tabla 1 y Figura 3). Los péptidos liofilizados fueron disueltos a 1 mg/mL, y posteriormente una dilución 1:5 se llevó a cabo. El efecto del pH sobre la estructura secundaria de los péptidos se evaluó en un rango de 3.8-13. En la evaluación del efecto de los lípidos sobre la estructura secundaria de los péptidos, se usó un pH de 7.2.

Péptidos derivados del C-terminal de CETP se usaron como control, el péptido nativo hélice-X (E₄₆₅-S₄₇₆) y la hélice-Z (E₄₆₅-S₄₇₆) con la mutación D₄₇₀N (Figura 3). Las soluciones se filtran a través de 0.22 μ m, la pureza de los péptidos fue mayor al 98 %, la cual se confirmó por espectrometría de masas y HPLC (GenScript).

Espectroscopía de DC

Los espectros de DC se obtuvieron con base a trabajos previos [9-11].

Análisis in silico

Se emplearon varios predictores de estructura secundaria, así como servidores para el análisis de la estructura del dominio C-terminal de CETPI. Para el análisis de la estructura tridimensional de la proteína CETP y BPI, se utilizó el algoritmo STRAP (Interactive Structure based Sequences Alignment Program). Las estructuras se obtuvieron del PDB código de acceso 2obd y 1bp1 para CETP y BPI, respectivamente.

Inmunodetección de CETPI por ELISA (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)

Las condiciones para el uso del anticuerpo anti-CETPI A₄₈₁-P₄₉₁ en ensayos de ELISA se establecieron con base en una patente anterior [12]. Mediante esta técnica se ha podido diseñar un método para la cuantificación de CETPI, y establecer las condiciones para el desarrollo de un kit. El nivel de mínimo de detección a través de este sistema es de 0.0007-0.004 µg, usando al péptido VSAK como referencia [12].

Microscopía electrónica de transmisión

Las muestras incubadas en las diferentes condiciones experimentales se procesaron usando la técnica de tinción negativa y fueron visualizadas a través de MET. Las muestras (10 µL) se colocaron en rejillas de cobre recubiertas de carbono por 10 min a 25°C, las cuales se tiñeron negativamente por 5 min con 0.1 % de ácido fosfotúngstico. Las muestras fueron visualizadas en un microscopio JEOL JEM-1200EX11 a 80 kV con una magnificación 20000x.

Ensayos de cosedimentación lípido/péptido y espectroscopía del enlace peptídico

Experimentos de cosedimentación se realizaron con una etapa de ultracentrifugación en un equipo Optima TLX y un rotor TLA-100.2 siguiendo la metodología descrita en la referencia [4]. Los sobrenadantes fueron recuperados y los pellets fueron suspendidos en un amortiguador de fosfatos pH 7.2. Posteriormente, se midió la absorbancia del enlace peptídico de los sobrenadantes y pellets a 205 y 218 nm.

Electroforesis en geles de gradiente de poliacrilamida

Muestras de LPA y lyso-C₁₂PC fueron procesadas empleando geles nativos de gradiente de poliacrilamida 3-35, 3-38 y 3-40%, en un buffer Tris-boratos durante 12 h a 80 V [16]. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie G-250 y negro de Sudán de acuerdo con trabajos previos [9]. Para la caracterización de las muestras de LPS, se estableció una nueva metodología a través del uso de geles de gradiente de 0.8-25 %. De esta forma, el método permite el estudio de la unión lípido-péptido bajo condiciones nativas sin que se modifique la unión [12].

Ensayos de fluorescencia

Para estos ensayos se emplearon LPS (O55:B5) acoplados a las sondas BODIPY FL y Alexa Fluor 488. Los espectros de emisión de fluorescencia fueron registrados a 25°C en un rango de 520-575 nm. Una longitud de onda de excitación a 503 nm se utilizó para la evaluación de los LPS-BODIPY FL y 519 nm para LPS-Alexa Fluor 488. Las muestras LPS-péptidos se incubaron a 30°C por 3 h y posteriormente las lecturas se realizaron en un espectrofluorímetro. La concentración de los LPS fue de 5 µg/mL.

Ensayos de fosfatasa alcalina (AP)

Se evaluó el efecto de la actividad de la AP sobre la unión VSAK-LPS. Los LPS O111:B4 (24 µg) se trataron con AP (5 U) por 1 h a 37°C. Después, la actividad de AP se inactivó con una etapa de 5 min a 70°C. El péptido VSAK (6 µg) fue incubado con

los LPS defosforilados toda la noche a 25°C. Posteriormente, las muestras se resolvieron a través de electroforesis en geles de gradiente (0.8-25 %), y fueron procesadas a través de WB.

Efecto de la fuerza iónica

El papel de la fuerza iónica sobre la unión VSAK-LPS fue evaluado por medio de concentraciones crecientes de NaCl. Esta condición se estudió mediante la electroforesis en geles de gradiente de poliacrilamida y WB, el efecto de la AP y a través de la fluorescencia asociada a los LPS-BODIPY FL.

Efecto protector del péptido VSAK sobre macrófagos

Cultivos celulares de macrófagos en placas de 96 pozos (14,000 células/pozo) con una confluencia del 80 % se trataron durante 45 min con concentraciones crecientes del péptido VSAK (0-1000 ng/mL), y después se estimularon con LPS 10 ng/mL por 24 h. Después del tratamiento, la viabilidad celular se midió a través del ensayo con MTT [10]. En otro panel experimental, los macrófagos recibieron un estímulo de LPS 10 ng/ml por 2, 4 y 12 h, después se adicionaron dosis crecientes de VSAK (100, 500 y 1000 ng/mL). En este caso, el experimento se prolongó durante 20 h, y la detección con MTT se realizó de acuerdo a protocolos anteriores [10].

Ensayos de unión celular de LPS

Los macrófagos en placas negras de 96 pozos (Santa Cruz Biotechnology) se incubaron por 2 h en medio libre de suero, se lavaron dos veces con PBS y se mantuvieron por 30 min a 4°C. Después, las células se incubaron con el péptido VSAK o polimixina B por 30 min. Inmediatamente, se adicionaron LPS-Alexa Fluor, y se continuó la incubación por 2 h a 4°C. Se realizaron dos lavados con PBS, y las mediciones de fluorescencia se realizaron con un lector de microplacas Synergy HT (BioTek), empleando una longitud de onda de excitación de 495 nm y de emisión a 519 nm, con un valor de ganancia de 120.

De la misma forma, la unión VSAK-LPS se caracterizó en el medio extracelular de cultivos de macrófagos. Las células RAW se trataron con el péptido VSAK por 45 min antes de la adición de LPS (LPS-BODIPY FL) bajo la relación de 1 molécula de LPS por 100 de péptido VSAK, posteriormente se continuó la incubación por 4 h. Los medios extracelulares fueron recuperados y se concentraron a través de una etapa con Centricon. La señal de fluorescencia fue seguida en un espectrofluorímetro, y las muestras se analizaron por electroforesis en geles de gradiente (0.8-25 %), y posteriormente se visualizaron en un equipo Typhoon 9400.

Especies reactivas de oxígeno (ERO)

Los macrófagos en placas negras de 96 pozos se incubaron por 1 h en medio libre de suero, posteriormente las células fueron tratadas con el péptido VSAK por 45 min (10 µg/mL). Después de un estímulo de LPS (100 ng/mL) por 4 h a 37°C, se incubó con la sonda fluorescente 6-carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (11 µM) por 15 min. Las células se lavaron y las lecturas de fluorescencia se realizaron en un lector de microplacas.

Ensayos microbianos

Placas de medio agar Mueller-Hinton se inocularon con *E. coli* enterohemorrágica en la presencia de sensidiscos impregnados con diferentes condiciones de péptidos, así como con los antibióticos control.

Microscopía confocal

Para la localización celular de los LPS-BODIPY FL y el efecto del tratamiento con el péptido VSAK, se utilizó un microscopio confocal de barrido FV1000. Después de 3 h de incubación, las imágenes celulares se obtuvieron con el uso de una longitud de onda de excitación a 503 nm y de emisión a 513 nm. De la misma forma, la localización celular de las ERO fue seguida empleando la sonda 6-carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato.

Ensayos de inmunoprecipitación

Macrófagos fueron tratadas con VSAK y LPS, bajo las condiciones descritas anteriormente. La separación de los núcleos fue realizada usando un buffer de sacarosa 250 mM/imidazol 3 mM pH 7.4 suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas. Las células se rasparon de las placas de cultivo y se pasaron 21 veces por una jeringa 22G. Para la recuperación de los núcleos, los lisados celulares se centrifugaron 3400 rpm por 15 min. Las dos fracciones (sobrenadante y sedimento) se lisaron por 25 min a 4°C, y ambas fracciones (20 µg/carril) se procesaron por SDS-PAGE, y después se transfirieron a membranas de PVDF. Para la detección de c-jun se utilizó el anticuerpo monoclonal de ratón anti-c-jun (1:500), para c-myc un anticuerpo policlonal de conejo anti-c-myc (1:600). Las membranas previamente bloqueadas se incubaron con los anticuerpos primarios y después de lavados sucesivos, se incubaron con los anticuerpos secundarios respectivos (1:5000), para realizar la detección por quimioluminiscencia.

Por otra parte, las fracciones de citoplasma (400 µg) y núcleo (300 µg) se incubaron con el anticuerpo anti-c-myc (1:400) por 2 h a 4°C, y los complejos inmunes se precipitaron con proteína G agarosa Fast Flow (Millipore) toda la noche a 4°C. Las proteínas inmunoprecipitadas se lavaron 3 veces y se resuspendieron en un buffer Laemmli. Las proteínas fueron separadas por geles SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de PVDF. La detección por WB de la proteína β-adaptina se realizó en base a protocolos anteriores [10].

Protocolo experimental en animales

Conejos machos Nueva Zelanda con un peso de 2 kg se mantuvieron en un ambiente con temperatura y humedad controladas, bajo condiciones de alimentación *ad libitum* y acceso libre al agua. La temperatura rectal inicial se midió en conejos con 24 h de ayuno. Después de 5 min, los animales se inocularon por vía intravenosa en la oreja con el péptido VSAK, y 10 min después con los LPS O111:B4 bajo una relación lípido-

péptido 1-200. La temperatura rectal se registró cada 30 min, y después de 90 min los animales fueron sacrificados de forma ética con pentobarbital sódico. Todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo a la Declaración de Helsinki y los principios rectores en el cuidado y uso de animales de experimentación.

Mediciones de TNF α en suero de conejos

Las muestras de sangre de los animales de experimentación se obtuvieron de la vena marginal de la oreja. Los tubos se centrifugaron por 15 min a 2000 rpm, el suero fue recuperado y se almaceno a -70°C. Para la medición cuantitativa, se empleo el kit TNF α ELISA de Cloud-Clone Corp. Las muestras de suero se diluyeron 1:3 en PBS y 100 μ L de esta solución se adicionaron a cada pozo de la placa de ELISA. Las muestras se incubaron por 2 h a 37°C, posteriormente se incubó con el reactivo de detección A por 1 h a 37°C, realizando 3 lavados posteriores. El reactivo B fue adicionado, se incubó durante 30 min a 37°C, y se realizaron 5 lavados. Después, la placa de ELISA se incubó por 25 min a 37°C con solución de sustrato. Por último, se adicionó solución de paro para realizar las lecturas a 450 nm.

6.4 Resultados y discusión

Diferencias en la estructura secundaria del C-terminal de CETPI y CETP

Considerando que CETPI no tiene el dominio clave C-terminal estructurado en α -hélice, como sucede en la hélice-X de CETP, se realizó una primer aproximación estructural de los últimos 18 residuos del C-terminal de CETPI. La caracterización estructural a través de espectroscopía de DC indica que el péptido VSAK (V₄₇₄-P₄₉₁), correspondiente a los últimos 18 residuos del C-terminal de CETPI se mantiene con una estructura desordenada (Fig. 1). De la misma forma, no se encontraron transiciones de estructura secundaria dependientes del pH (Fig. 1A), como se ha reportado anteriormente en péptidos derivados de CETP [10]. A través de la evaluación de la elipticidad molar media a 219 nm, solamente en un rango de pH de 8.6-9.5 se registró un ligero aumento en los valores de elipticidad (Fig. 1B). De manera similar, la estructura secundaria correspondiente a los últimos 11 residuos (péptido ARS) se mantuvo en un estado desordenado (datos no mostrados).

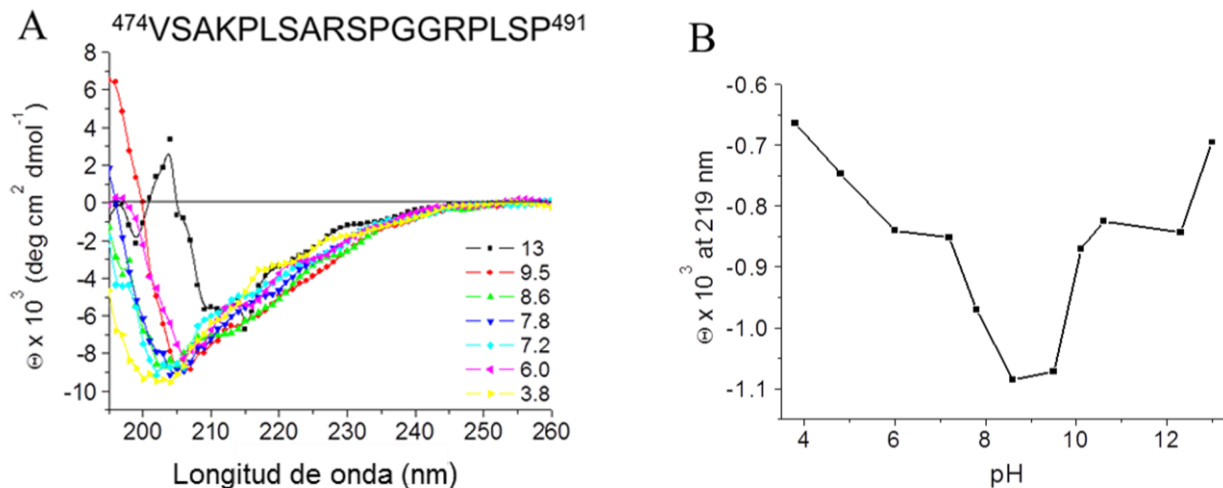


Fig. 1. Caracterización estructural del dominio C-terminal de CETPI utilizando espectroscopía de DC. **A)** Los espectros de DC se obtuvieron en un intervalo de pH de 3.8-13.0. **B)** Bajo las mismas condiciones, se muestran los valores de elipticidad molar media (Θ) a 219 nm.

En un trabajo anterior, hemos descrito la presencia de cambios en la estructura secundaria de la hélice-X de CETP dependientes del microambiente específico de lípidos, tales como micelas de lisofosfatidilcolina o LPA [4], en donde las transiciones estructurales están acopladas a un fenómeno de ordenamiento de lípidos [11]. No obstante, dichas transiciones no se producen cuando se evalúan péptidos derivados del C-terminal de CETPI (Fig. 2A). En estos experimentos, la estructura secundaria desordenada en el péptido VSAK se mantiene bajo concentraciones crecientes de LPA, y los valores de elipticidad a 222 nm (señal de α -hélice) se mantienen constantes. Sin embargo, usando las mismas condiciones experimentales en la hélice-X se observó una respuesta sigmoideal asociada a la presencia de dos estados conformacionales (Fig. 2B). Los resultados sugieren una modulación estructural diferente, que es dependiente del microambiente de lípidos entre los dominios C-terminal.

Asimismo, se desarrolló una nueva metodología para caracterizar las interacciones péptido-lípido, a través de ensayos de cosedimentación acoplados a la espectroscopía del enlace peptídico [9]. De esta forma, hemos demostrado que la hélice-X en solución no sedimenta, y la presencia de lípidos como el LPA facilita la formación

de micelas, de manera que la sedimentación péptido-lípido se lleva a cabo. Además, la electroforesis en geles nativos de gradiente de poliacrilamida confirma el fenómeno de unión a lípidos que se muestra por la presencia de bandas solamente cuando se logra la asociación óptima entre los lípidos y la hélice-X. Cuando el péptido VSAK fue evaluado bajo las mismas condiciones, no se registraron estos fenómenos, encontrándose una respuesta diferente a la hélice-X. El procesamiento de las muestras a través de los geles de gradiente no permitió la identificación del péptido VSAK sobre la matriz de poliacrilamida (Fig. 2C), ya que al no llevarse a cabo la unión VSAK-lípido los péptidos no quedan retenidos en la matriz. De esta forma, la asociación óptima péptido-lípido podría estar conectada con una transición estructural desorden- α -hélice solamente en el C-terminal de CETP [9], y considerando la presencia de un estado desordenada este proceso no ocurre en CETPI.

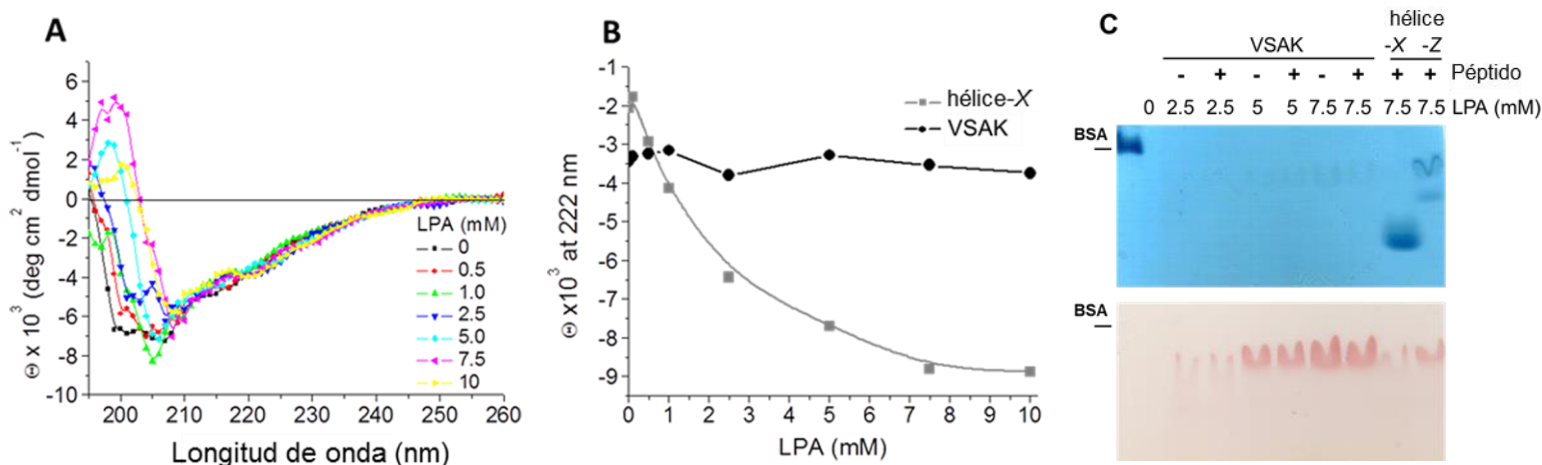


Fig. 2. El ácido lisofosfatídico (LPA) no promueve la formación de la estructura α -hélice en el C-terminal de CETPI. **A)** Espectros de DC del péptido VSAK bajo concentraciones crecientes de LPA. **B)** Valores de elipticidad a 222 nm del péptido VSAK y la hélice-X bajo el tratamiento con LPA. **C)** Geles nativos de gradiente de poliacrilamida (3-40%) de las muestras procesadas a través de ensayos de cosedimentación. Se muestra la tinción con azul de Coomassie y negro de Sudán.

Específicamente, las características del LPA tales como el grado de solvatación determinado por la presencia de un grupo hidroxilo libre y un grupo de cabeza polar reducido pueden facilitar el reconocimiento molecular sobre la hélice-*X* anfipática, permitiendo la interacción de los monómeros de los péptidos sobre la superficie de los lípidos [11]. No obstante, este fenómeno no se lleva a cabo cuando se evaluó el péptido VSAK. Siendo el C-terminal de CETPI una secuencia menos modulable, la carga positiva, la condición hidrofílica, y la presencia de prolinas son características importantes para una nueva función.

El análisis de la secuencia de los dominios C-terminal de CETPI y CETP, indica que en una condición cercana a un pH neutro (Fig. 3), la carga electrostática neta de la hélice-*X* es de alrededor de -2, en contraste en el péptido ARS es +2 y en VSAK +3, valores que se mantienen en un amplio rango de pH. En tanto que el tamaño de la secuencia aumenta, la carga electrostática positiva disminuye, como en el fragmento de 27 residuos denominado INPE con una carga de +1, o en los péptidos EII (29 aa), SKG (36 aa) y SRL (48 aa) en donde la carga electrostática neta es 0. De esta manera, la carga neta positiva más alta está determinada al fragmento VSAK de 18 residuos (Fig. 3), el cual podría permanecer como un dominio libre en la estructura global de la proteína. Esta condición representa un indicio para una función de CETPI relacionada con la interacción a superficies de lípidos cargadas negativamente, tales como las membranas de bacterias Gram-negativas, y en particular con LPS. En adición, los valores de los parámetros fisicoquímicos del péptido VSAK como el momento hidrofóbico (μH) se encuentran en valores intermedios entre la hélice-*X* y los que se obtienen con secuencias más largas derivadas de CETPI, hasta de 27 residuos (Tabla 1), así mismo VSAK presenta el punto isoeléctrico más alto y mantiene un carácter hidrofílico. Considerando un balance entre el tamaño de la secuencia y la carga electrostática neta, la secuencia óptima está determinada al péptido VSAK.

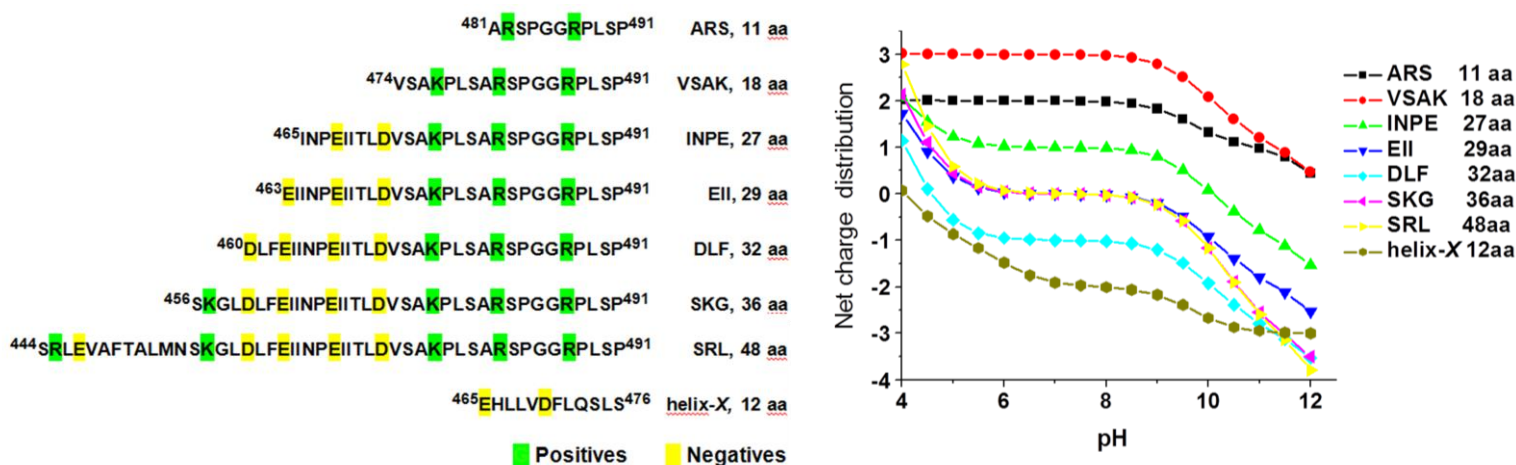


Figura 3. Análisis de la secuencia de los últimos 48 residuos del C-terminal de CETPI. El panel de la izquierda muestra la secuencia de aminoácidos de varios péptidos derivados del C-terminal, se identifican los residuos con carga positiva (verde) y carga neta negativa (amarillo). Distribución de la carga neta electrostática de los péptidos en función del pH. La hélice-X de CETP fue usada como control.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de los péptidos derivados del dominio C-terminal de CETPI.

Párametro	hélice-X	hélice-Z	ARS	VSAK	INPE	EII	SKG	SRL
Residuos	12	12	11	18	27	29	36	48
MW (Da)	1399.8	1399.6	1094.2	1774	2786.2	3028.5	3789.4	5122.9
Punto isoeléctrico	4.17	5.13	12.4	12.41	10.08	7.13	7.13	7.2
Hidrofobicidad*	0.27	0.28	-0.22	-0.078	0.054	0.072	0.092	0.11
μH^*	0.41	0.41	0.297	0.17	0.058	0.106	0.053	0.087

*Unidades kcal/mol

Algunos autores han considerado que las propiedades dinámicas de los péptidos antimicrobianos (AMP) son importantes para sus funciones biológicas, en algunos casos, la rigidez estructural puede conducir a una disminución de la actividad [17]. De este modo, la estructura secundaria desordenada en el C-terminal de CETPI es una característica que podría facilitar la interacción con superficies cargadas negativamente, como los LPS.

Caracterización funcional de los péptidos

Tomando en cuenta nuestros experimentos previos, enfocados en el estudio de la unión del C-terminal de CETP a diferentes arreglos de lípidos [9], y en base a protocolos en donde la electroforesis SDS-PAGE se ha utilizado para la caracterización del lípido A y el antígeno-O de los LPS [18], hemos desarrollado un nuevo protocolo empleando geles nativos de gradiente de poliacrilamida para asegurar que las interacciones LPS-péptido no se modifiquen por los procedimientos experimentales.

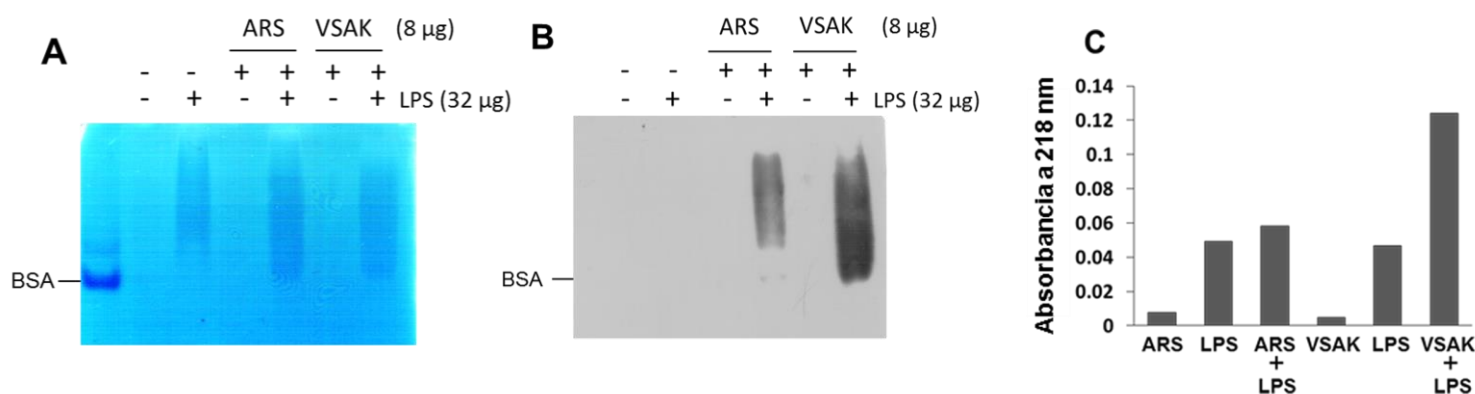


Fig. 4. El dominio C-terminal de CETPI presenta la capacidad de unión a LPS. **A)** Electroforesis en un gel nativo de gradiente de poliacrilamida (0.8-25 %) empleando LPS, ARS, VSAK y una mezcla de LPS con péptido. Gel teñido con azul de Coomassie. **B)** Western blot usando un anticuerpo que reconoce al dominio C-terminal de CETPI. **C)** Absorbancia del enlace peptídico de las muestras de pellets obtenidas después de los ensayos de cosedimentación.

En este tipo de electroforesis de LPS es común observar un patrón característico de barrido en el corrimiento electroforético de las muestras, en lugar de tener bandas bien definidas, fenómeno que está relacionado con el alto contenido de polisacáridos [18]. Bajo nuestras condiciones, el mismo arreglo se ha registrado con los LPS (Fig. 4A), y cuando los péptidos del C-terminal de CETPI se resolvieron en los geles no se observó ningún patrón de barrido. No obstante, un patrón de migración más amplio se visualizó sólo cuando los LPS y los péptidos se incubaron juntos (Fig. 4A), condición que puede estar asociada con un fenómeno de ordenamiento de lípidos, el cual se ha caracterizado a través de ensayos de microscopía electrónica de transmisión (comunicación personal). Cuando se analizaron las muestras de la Figura 4A a través de WB, empleando el anticuerpo anti-CETPI A481-P491 que reconoce específicamente el dominio C-terminal, encontramos la señal exclusivamente en los carriles correspondientes a LPS que se incubaron con los péptidos (Fig. 4B), e incluso la señal más fuerte se encontró en el carril de VSAK. Los resultados sugieren que los péptidos pueden interactuar con los LPS, y sólo bajo esta condición se mantienen en la matriz de poliacrilamida. Nuestra propuesta está apoyada con experimentos complementarios. A través del empleo de la espectroscopía del enlace peptídico después del procedimiento de cosedimentación, se detectó la presencia de VSAK exclusivamente en las muestras incubadas con LPS (Fig. 4C).

Adicionalmente, cuando se evaluaron vesículas de lípidos compuestas de fosfatidilcolina, el extracto polar de lípidos de *E. coli*, y vesículas cargadas negativamente (POPC/POPG), el cambio en el patrón de migración electroforética descrito anteriormente no fue identificado (datos no mostrados). En su conjunto, los resultados sugieren que no hay cambios en la estructura secundaria dependientes de lípidos en el C-terminal de CETPI, y a diferencia de secuencias como los péptidos antimicrobianos, el dominio C-terminal no podría desestabilizar a membranas lipídicas. En particular, se ha sugerido que la toxicidad debida a la molécula de referencia PmB está relacionada con una alta afinidad e interacciones fuertes con las membranas de lípidos negativas, induciendo su desestabilización [19], lo cual puede generar efectos

adversos. De esa manera, la propiedad de unión a lípidos en el péptido VSAK puede estar determinada por interacciones electrostáticas solamente en la superficie de los LPS.

En experimentos adicionales en los que se evaluó la especificidad de la unión a los LPS, se emplearon los péptidos hélice-X y hélice-Z. Sin embargo, la señal de WB no se registró cuando estos péptidos fueron evaluados, y solamente fue evidente la señal y el patrón de barrido más amplio en las muestras de LPS incubadas con ARS o VSAK, siendo siempre mayor la señal en el péptido VSAK (Fig. 5A). Por otra parte, se detectó la señal de unión de VSAK con los tres serotipos de *E. coli* evaluados O111:B4, O26:B6 y O55:B5, asimismo el patrón de barrido en los geles de poliacrilamida fue confirmado a través de la tinción para lípidos con negro de Sudán (Fig. 5B). Con el objetivo de ampliar la relación LPS-CETPI desde una perspectiva celular, la expresión proteica en células derivadas de colon fue evaluada bajo el estímulo de concentraciones graduales de LPS, encontrándose un aumento en la expresión de CETPI en 1 y 10 ng/mL de LPS. De forma interesante, en condiciones basales o bajo el estímulo con LPS no se detectó la expresión de CETP (Fig. 5C).

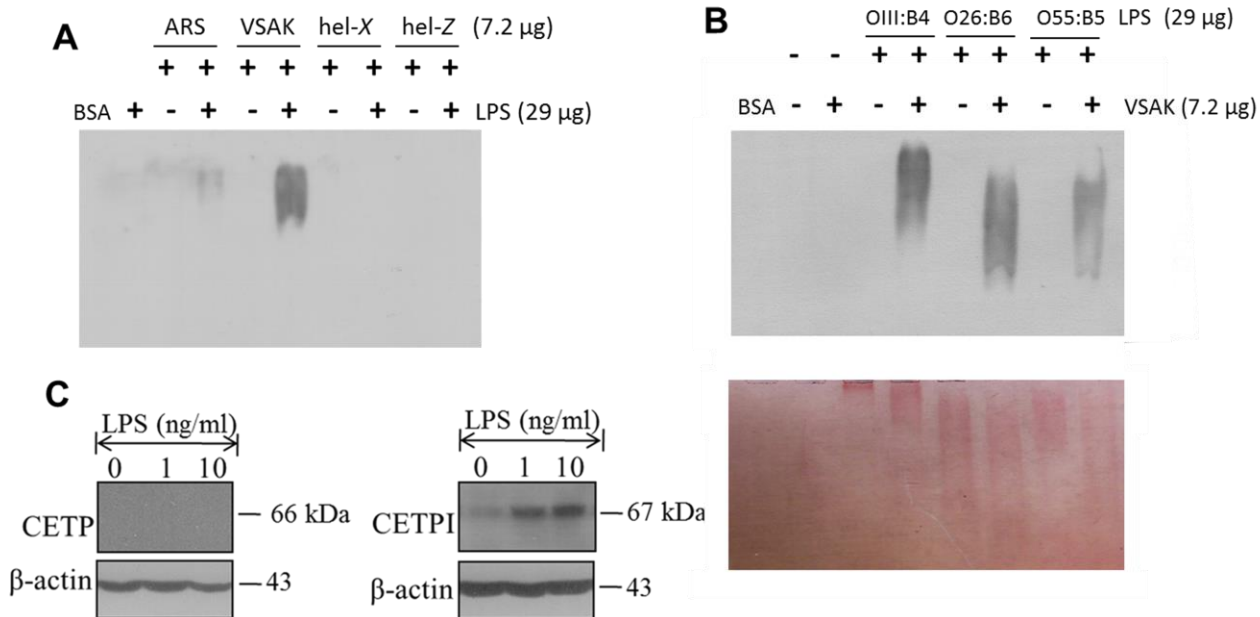


Fig. 5. La unión a LPS está determinada a los últimos 18 residuos del C-terminal de CETPI, y abarca varios serotipos de LPS. **A)** Empleando el C-terminal de CETPI, la unión péptido-LPS fue detectada solamente con VSAK a través del uso del serotipo O111:B4 de LPS. **B)** La unión VSAK-LPS fue identificada empleando los serotipos O111:B4, O26:B6 y O55:B5, a través de WB y mediante la tinción de negro de Sudán. **C)** Expresión de CETPI y CETP en células Caco2, bajo el tratamiento con LPS. Se emplearon anticuerpos que reconocen a los respectivos dominios C-terminal. La proteína β-actina se usó como control de carga.

Con un enfoque más completo, se evaluó la expresión de CETPI en células de intestino delgado. Cuando las células FHs74Int fueron tratadas con concentraciones graduales de LPS, se detectó un aumento en la expresión de CETPI desde 0.1 ng/mL, esta respuesta se mantuvo hasta la concentración de 1000 ng/mL (Fig. 6A). De la misma forma, la banda de la proteína fue identificada en muestras recuperadas del medio extracelular (datos no demostrados). En la evaluación de la CETP bajo el mismo estímulo, únicamente se registró la banda que corresponde a CETP hasta una concentración de 100 ng/ml de LPS (Fig. 6A).

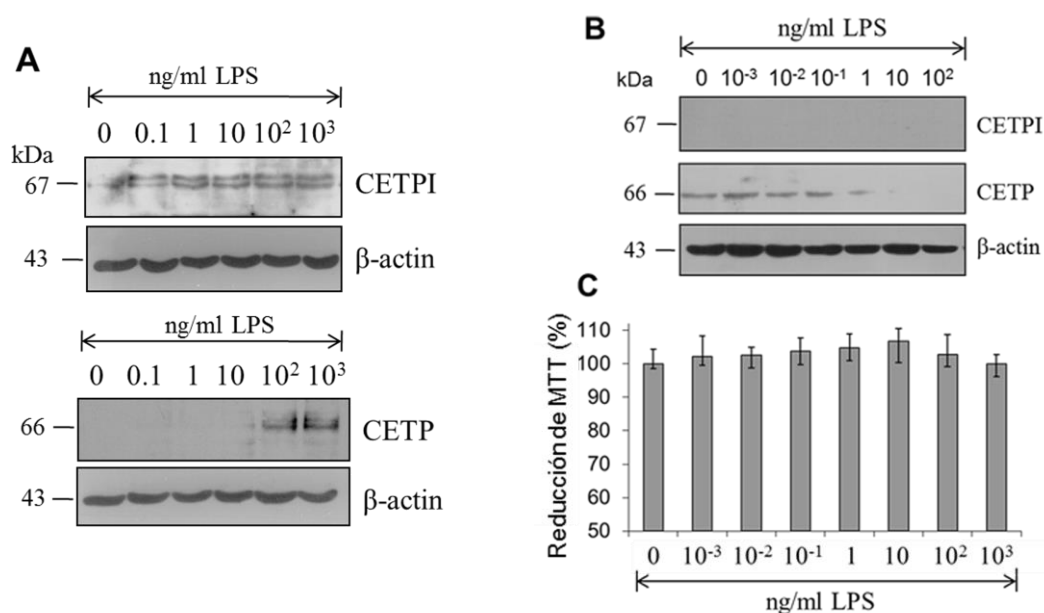


Fig. 6. Expresión diferencial de CETPI y CETP en células bajo un estímulo con LPS. **A)** Niveles de expresión de CETPI/CETP después de 12 h de tratamiento con concentraciones graduales de LPS, en el modelo de células de intestino delgado (FHs74Int). **B)** WB de CETPI/CETP en células HepG2 tratadas con LPS. **C)** En las mismas condiciones, se determinó la viabilidad celular por MTT. La β -actina se utilizó como control de carga.

Previamente, el RNAm de CETPI se detectó en el intestino delgado y no en el hígado [7], siendo el principal órgano de síntesis de CETP. De manera que la expresión de CETP y CETPI se evaluó en células HepG2, detectándose solamente la presencia de CETP, lo cual concuerda con nuestros resultados previos [7]. El tratamiento con dosis

crecientes de LPS (0.001-100 ng/mL) desencadena una disminución evidente de la CETP, mientras que bajo las mismas condiciones no se observó la banda de CETPI (Fig. 6B). En consecuencia, con el fin de determinar si la disminución de CETP podría estar asociada con cambios en la viabilidad celular de HepG2, se realizaron ensayos de MTT, y no se encontraron diferencias significativas (Fig. 6C). De tal forma que las diferencias en la expresión de CETP y CETPI en células de intestino delgado y HepG2 estimuladas con LPS, sugieren una expresión específica que puede estar asociada con una función diferente de las proteínas.

Siendo importante para el estudio de la unión VSAK-LPS, se empleó un sistema de detección de ELISA desarrollado por nuestro grupo de trabajo para completar la caracterización [12]. Cuando los LPS (0.032 μ g) se acoplaron a la superficie de la placa, se identificó un aumento de la señal de densidad óptica (OD) solamente en las muestras incubadas con VSAK (0.004 μ g), como un indicativo de que el proceso de unión se lleva a cabo (Fig. 7A). Los resultados de otro experimento, empleando una cantidad constante de VSAK, mostraron un aumento de la señal exclusivamente en las muestras incubadas con LPS, bajo un rango de 0.004 a 0.032 μ g (Fig. 7B). Como experimento complementario, esta vez usando un anticuerpo IgG que reconoce el lípido A, se acopló el péptido VSAK a la superficie de la placa y un aumento en la señal fue identificado únicamente cuando los LPS están presentes (Fig. 7C). De manera conjunta, la evidencia experimental demuestra que la propiedad de unión a LPS está determinada al péptido VSAK.

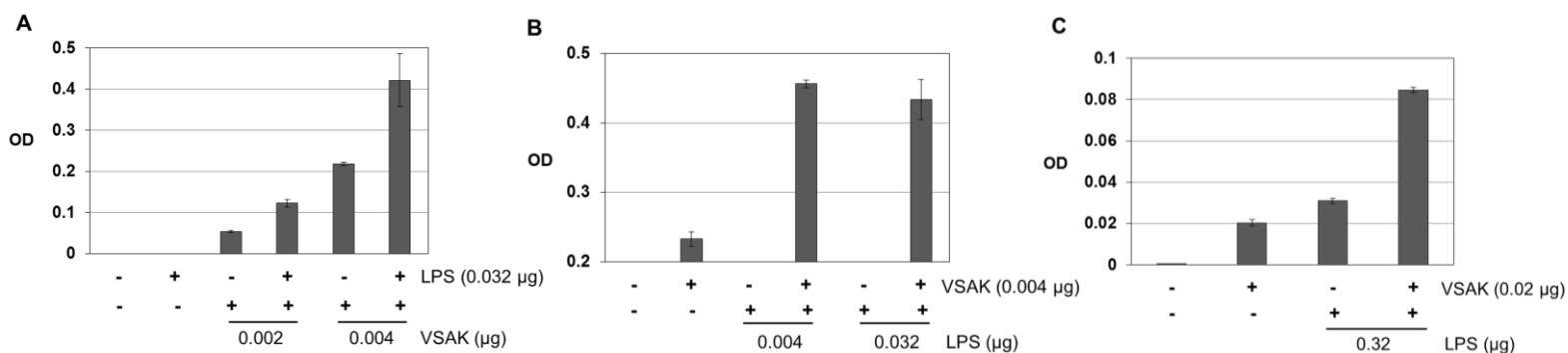


Fig. 7. Caracterización de la unión VSAK-LPS a través de ensayos de ELISA. **A)** Se identificó un incremento en la OD en placas de ELISA con LPS acoplados a la superficie, solamente cuando las muestras se incubaron con VSAK. **B)** Si la concentración de VSAK es mantenida, un incremento en la OD ocurre bajo la incubación con LPS. En ambos experimentos se utilizó un anticuerpo que reconoce el C-terminal. **C)** El mismo fenómeno se observa si la placa es acoplada con VSAK y se incuba posteriormente con LPS. En este caso, se utilizó un anticuerpo que reconoce al lípido A.

Con la finalidad de ampliar la caracterización de la unión a LPS, se emplearon los LPS-BODIPY FL. A través de la utilización de 5 µg/mL de LPS, se registró un incremento en los espectros de emisión de fluorescencia bajo la incubación con concentraciones graduales del péptido VSAK (Fig. 8A), mientras que los valores de fluorescencia intrínsecos de VSAK se mantiene cercanos a 0 a.u. en todas las concentraciones evaluadas (datos no mostrados). De hecho, el pico más alto en los espectros de emisión fue registrado a 531 nm, en donde existe un incremento evidente en la fluorescencia desde 50 µg/mL de VSAK, hasta la concentración más alta de 1000 µg/mL que corresponde a una relación 1-200 de LPS-VSAK (Fig. 8B). Este aumento en la fluorescencia se ha descrito en proteínas como BPI y LBP [20], fenómeno relacionado con una inducción en la exposición de la sonda que está acoplada a la molécula de LPS.

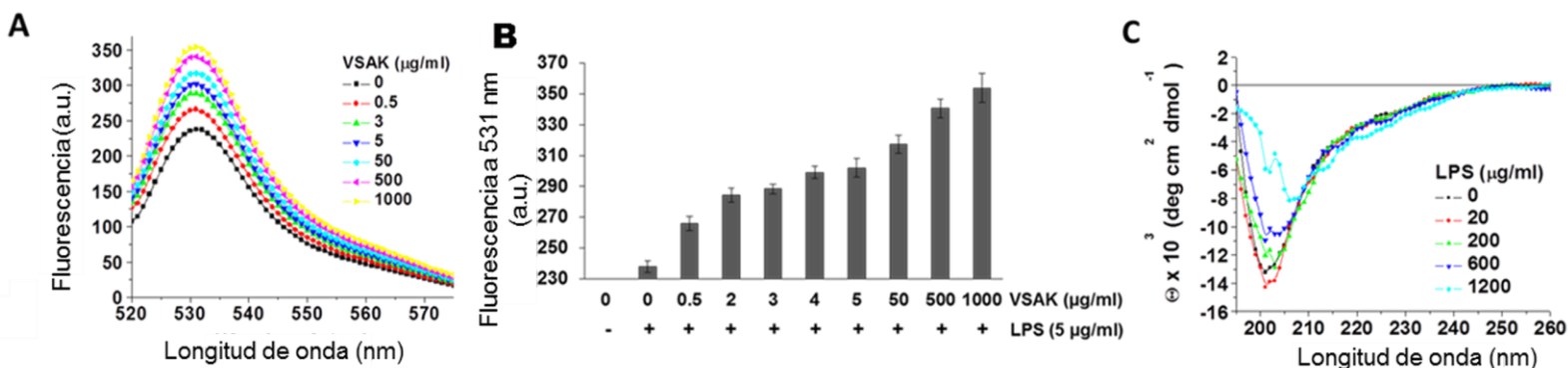


Fig. 8. Caracterización de la unión a LPS a través de fluorescencia. **A)** Efecto del tratamiento con el péptido VSAK sobre la sonda LPS-BODIPY FL. Espectros de emisión en un rango de 520-575 nm, usando una longitud de onda de excitación de 513 nm. **B)** Valores de emisión de fluorescencia a 531 nm (valor máximo) en concentraciones crecientes de VSAK. **C)** Efecto de la incubación con concentraciones graduales de LPS (O55: B5) sobre la estructura secundaria del péptido VSAK (200 μg/mL) monitoreado por DC.

De forma interesante, la exposición de la sonda podría estar asociada con cambios en la conformación de los LPS, debido a la incubación con el péptido VSAK. En este sentido, cuando se procesaron muestras de LPS a través de MET, los resultados obtenidos sugieren la presencia de un reordenamiento de lípidos inducido por el tratamiento con VSAK, registrándose la formación de estructuras multilamelares (datos no mostrados). De la misma manera, otros grupos utilizando péptidos menores a 10 residuos, han reportado cambios conformacionales en las partículas de LPS [21]. Sin embargo, cuando se evaluó el efecto de los LPS sobre la estructura secundaria del péptido VSAK, no se encontraron cambios en la estructura de VSAK dependientes de la incubación con LPS, permaneciendo el péptido en un estado desordenado (Fig. 8C).

La unión VSAK-LPS está caracterizada por interacciones electrostáticas

Por otro lado, se evaluó el efecto de la fuerza iónica sobre la actividad de unión a LPS del péptido VSAK, bajo un amplio rango de concentración de NaCl (0-1400 mM). Los resultados muestran una disminución en la señal de unión determinada por WB desde 200 mM de NaCl, esta condición se extendió a 800 y 1400 mM de NaCl (Fig. 9A). Cuando los LPS-BODIPY FL se evaluaron bajo las mismas condiciones, desde 400 mM de NaCl, se registró una reducción significativa en los valores de fluorescencia a 531nm, adquiriendo valores similares a las muestras control que no se trataron con VSAK (Fig. 9B). De igual forma, los espectros de emisión de los LPS bajo el mismo tratamiento de fuerza iónica se superponen con las muestras de LPS que no recibieron VSAK (Fig. 9C). De esta manera, la característica de unión a VSAK podría estar determinada por interacciones electrostáticas en la superficie de los lípidos, y tomando en cuenta que el péptido VSAK abarca los últimos 18 residuos, la K₄₇₇, R₄₈₂ y R₄₈₇ deben ser los aminoácidos clave para la función.

Considerando el efecto del péptido VSAK sobre la exposición de los LPS-BODIPY FL (Fig. 8), puede ser factible que la unión se lleve a cabo a nivel del lípido A. Los estudios previos han mostrado que los efectos biológicos de los LPS se reducen, si son modificadas las cargas negativas en los grupos fosfato del lípido A [22]. En este contexto, se realizaron experimentos de desfosforilación empleando la AP, los resultados mostraron una disminución en la unión de VSAK a los LPS evaluada a través de WB (Fig. 9D). Los datos sugieren que la unión VSAK-LPS puede estar relacionada con la neutralización de las cargas electrostáticas negativas en los grupos fosfato. De forma interesante, VSAK comparte algunas características similares con el dominio-N de la proteína LBP, y se ha propuesto que un cluster de residuos positivos en la punta del dominio-N es el sitio clave para la interacción con LPS. Incluso, péptidos sintéticos que contienen esta secuencia muestran una actividad bloqueadora de los LPS, mientras que las mutaciones de los residuos R₉₄, K₉₅ y K₉₉ suprimen esta unión [23,24].

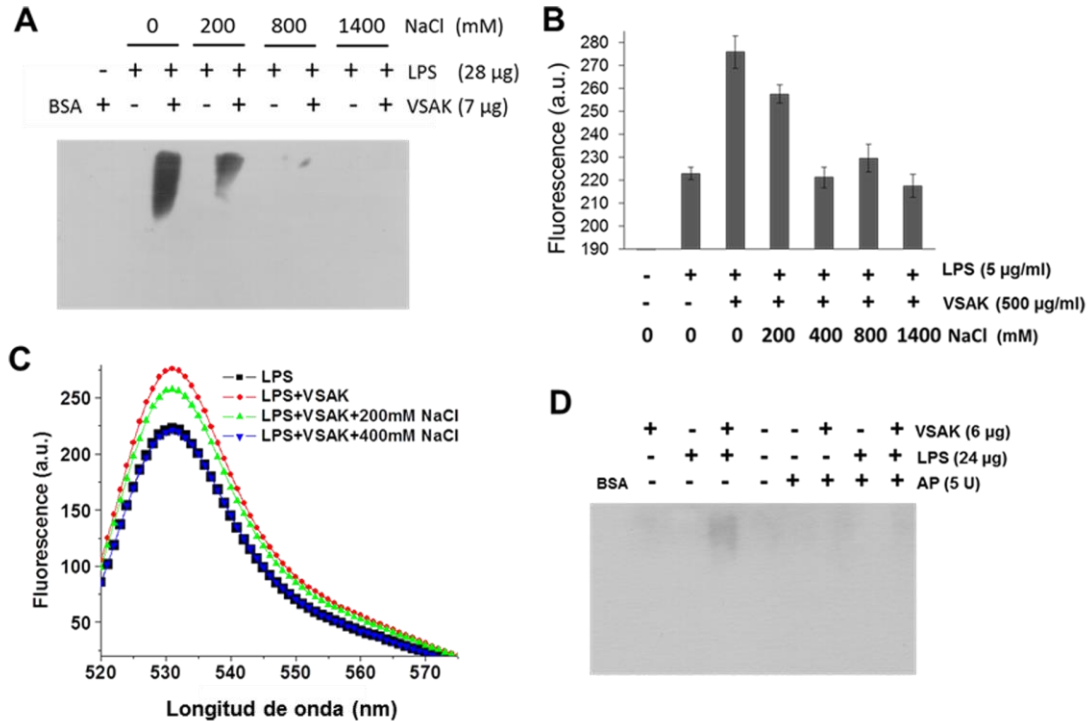


Fig. 9. La unión LPS-VSAK está determinada por interacciones electrostáticas en el lípido. **A.)** Efecto de la fuerza iónica en la unión LPS-VSAK, evaluado con concentraciones crecientes de NaCl y visualizado por WB en geles nativos de gradiente de poliacrilamida. **B)** Valores de emisión de fluorescencia a 531 nm, y **(C)** espectros de emisión de fluorescencia generados bajo las mismas condiciones en la sonda BODIPY-LPS. **D)** Efecto de la defosforilación en la unión VSAK-LPS evaluada a través de la actividad de la AP.

Aunque el péptido VSAK presenta una estructura desordenada, mantiene la capacidad de interacción con los LPS, condición que está conectada con una asociación sutil lípido-péptido sobre la superficie. En este sentido, se ha descrito que las fuerzas conductoras para la adsorción de péptidos en membranas lipídicas son las interacciones hidrofóbicas, electrostáticas y puentes de hidrógeno [25]. Si el péptido y la membrana se mantienen cargados, entonces las interacciones electrostáticas son las dominantes, dando como resultado curvas de unión no lineales [25]. Por lo tanto, las interacciones débiles del C-terminal de CETPI deben llevarse a cabo en la superficie de los LPS, y deben estar determinadas por un componente electrostático.

El concepto de reordenamiento de lípidos se ha asociado con un fenómeno de multilamellarización descrito en algunos péptidos que interaccionan con LPS [26,27]. Esta propuesta sugiere que la formación de micelas con un tamaño reducido está relacionado con fenómenos de protección, ya que esta conformación de los LPS no es la óptima para el reconocimiento por proteínas como LBP, lo cual puede favorecer la cascada proinflamatoria [28]. De esta manera, la propiedad de unión a LPS presente en el péptido VSAK puede estar acompañada de un reordenamiento de lípidos, conducido a su vez por un componente electrostático que puede favorecer una reducción de los efectos citotóxicos de los LPS.

Efecto bloqueador del péptido VSAK sobre LPS

Los macrófagos fueron usados, tomando en cuenta que representan un modelo celular bien definido para el estudio de los efectos biológicos de los LPS [29]. Las células se incubaron durante 45 min con concentraciones crecientes del péptido VSAK (0-1000 ng/mL), y luego se estimularon con una dosis de 10 ng/mL de LPS. Empleando el ensayo de MTT, se detectó que los LPS inducen una disminución del 50 % en la viabilidad celular, mientras que este efecto se redujo gradualmente bajo el tratamiento con VSAK (Fig. 10A). El efecto protector más alto se observó con 1000 ng/mL de VSAK, lo que representa una relación lípido-péptido de 1-100. Bajo estas condiciones, durante los experimentos no se registraron efectos citotóxicos producidos por el péptido VSAK. A través del uso de los LPS-BODIPY FL, se confirmó que bajo la misma relación lípido-péptido existe un claro efecto de VSAK sobre la internalización de la sonda LPS-BODIPY FL (Fig. 10B,C).

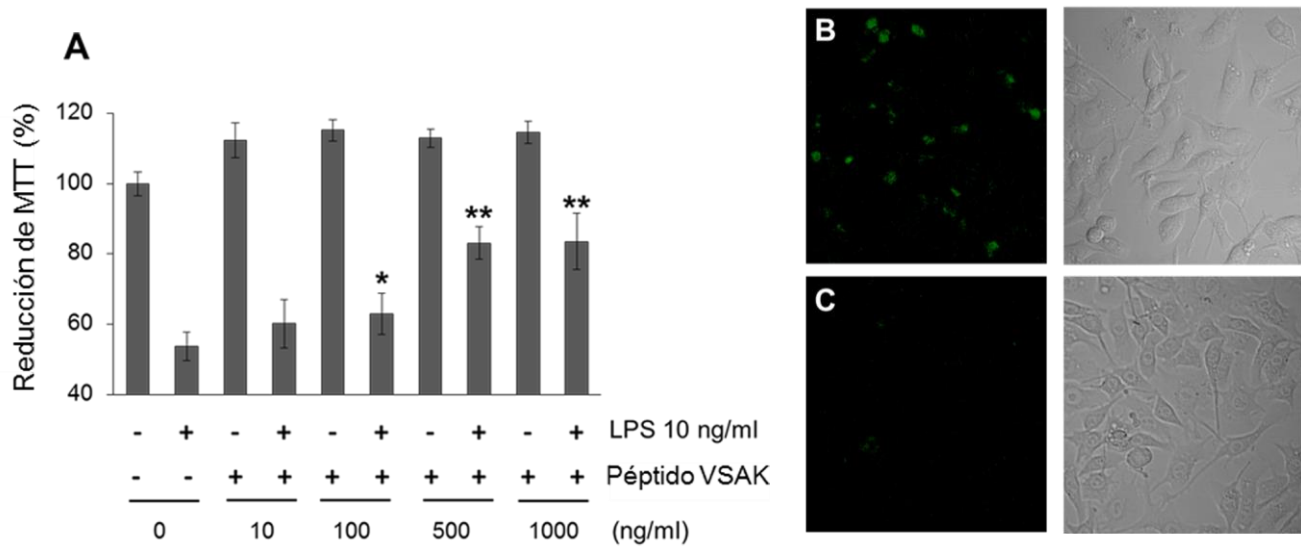


Fig. 10. El péptido VSAK previene del desarrollo de citotoxicidad en macrófagos. **A)** Gráfica de la viabilidad celular, evaluada por MTT en células tratadas durante 45 min con dosis crecientes de VSAK, antes del estímulo con 10 ng/mL de LPS. Se presentan las medias (n=6, $X \pm DE$), *p < 0,05, **p < 0.001 con respecto al grupo control. **B)** Imágenes de macrófagos estimulados con LPS-BODIPY FL (0.5 $\mu\text{g/mL}$) por 4 h, y **(C)** efecto del tratamiento con el péptido VSAK (50 $\mu\text{g/mL}$) con la misma dosis de LPS.

En un análisis más completo del efecto protector del péptido VSAK, los macrófagos fueron estimulados con 10 ng/mL de LPS de forma previa al tratamiento con VSAK en diferentes tiempos de incubación. El experimento control representa 0 h, una condición sin el estímulo con LPS antes de la adición del péptido VSAK (Fig. 11A). Las otras condiciones fueron realizadas a 2 h (Fig. 11B), 4 h (Fig. 11C) y 12 h (Fig. 11D) de incubación con LPS, posteriormente se aplicó el tratamiento con VSAK en dosis crecientes, y en todas las condiciones se mantuvo la incubación con LPS durante 24 h. Los resultados demuestran que cuando se adiciona el tratamiento con la concentración más alta de VSAK (1000 ng/mL), que corresponde a una relación lípido-péptido 1-100, los valores de viabilidad celular en los tratamientos con VSAK no disminuyen a los niveles encontrados en las células que sólo recibieron LPS, de manera que los niveles de viabilidad se mantuvieron similares a los controles. En este sentido, se concluye que el péptido VSAK realiza una función de protección contra los efectos citotóxicos inducidos por los LPS. De forma interesante, los ampliamente caracterizados LPS 0111:B4 tiene la propiedad de ser el único serotipo que activa una respuesta diferente a la vía canónica de macrófagos a través del receptor TLR-4, esta respuesta es intracelular y conduce a la activación de la caspasa inflamatoria-11 [30,31], y el péptido VSAK podría ejercer un efecto protector contra este serotipo.

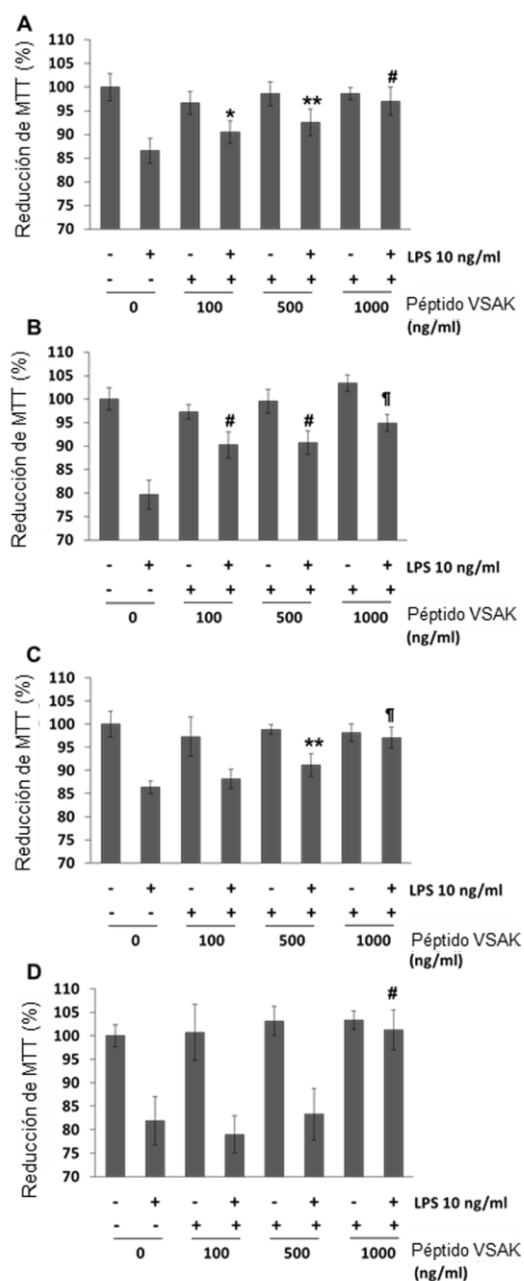


Fig. 11. El tratamiento con VSAK protege de los efectos citotóxicos de LPS en macrófagos. **A)** Experimento control, con una incubación de VSAK por 45 min antes del estímulo con 10 ng/mL de LPS. **B)** Efecto sobre la viabilidad celular producida por el tratamiento con 2 h de LPS antes de la adición de VSAK, de la misma forma durante 4 h (**C**) y 12 h (**D**). En todas las condiciones, después de la administración de VSAK, las células se incubaron por 20 h. Se presentan los valores de las medias ($n=6$, $X \pm DE$), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, # $p < 0,001$, ¶ $p < 0,0001$ con respecto al grupo control.

De la misma forma, el efecto citotóxico debido solamente el péptido VSAK se evaluó en otras blancos celulares. Una de las principales causas de rechazo de moléculas durante el desarrollo de fármacos está asociada con los efectos citotóxicos, especialmente relacionados con hepatotoxicidad. En este sentido, se evaluaron células HepG2 derivadas de hígado. No se registró una disminución en la viabilidad celular empleando una concentración de hasta 56 $\mu\text{g/mL}$ de VSAK, condición muy por arriba de las dosis a la que fue evidente un efecto protector en los macrófagos. Además, en las células de microglia, que son muy sensibles a estímulos tóxicos [32], no se observaron efectos adversos (datos no mostrados). En todos los casos, el tratamiento de VSAK en cultivos de células mostró ser altamente seguro.

Caracterización celular

El efecto protector que presenta el péptido VSAK está relacionado con una característica de unión a LPS. Se ha demostrado que el péptido VSAK puede interactuar con varios serotipos de LPS, y a través de esta característica podría prevenir la interacción con los receptores blanco tales como los TLR-4, disminuyendo la cascada inflamatoria. Por lo tanto, VSAK disminuiría la actividad citotóxica de los LPS, manteniendo a estos lípidos en una forma inactiva, por medio de un mecanismo de unión débil pero suficiente para generar condiciones de protección. De hecho, con la finalidad de proporcionar mayor sustento experimental a nuestra hipótesis, la interacción VSAK-LPS se caracterizó bajo condiciones de cultivo celular en macrófagos (Fig. 12). Empleando los LPS-BODIPY FL, los resultados indican la presencia de la señal de fluorescencia en el medio extracelular, registrándose un ligero aumento en la fluorescencia bajo la adición del péptido VSAK (Fig. 12A) de manera similar a los resultados *in vitro* mostrados en la figura 8. Además, se observaron los cambios en el patrón de migración electroforética bajo el tratamiento con VSAK (Fig. 12B).

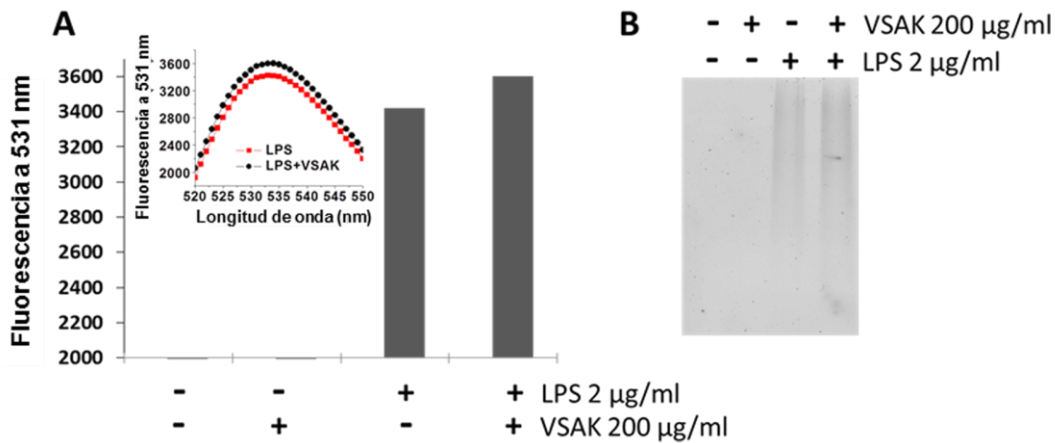


Fig. 12. La unión VSAK-LPS ocurre bajo condiciones de cultivo celular en macrófagos. **A)** Fluorescencia de los medios extracelulares obtenidos de células RAW tratadas con VSAK, LPS-BODIPY FL, y ambas moléculas. El inserto muestra los espectros de emisión en un rango de 520-550 nm. **B)** Las muestras fueron procesadas a través de geles de gradiente de poliacrilamida (0.8-25 %), y visualizadas con un equipo Thyphoon 9400.

Incluso, hemos demostrado que el tratamiento con el péptido VSAK origina una disminución en la unión de LPS a los receptores de macrófagos. Con base en un ensayo estandarizado de unión a macrófagos [33], las células fueron estimuladas con LPS-Alexa Fluor de *S. minnesota* por 2 h a 4°C, los resultados indican que el tratamiento con VSAK induce una disminución de la cantidad de sonda que se une a la superficie celular. Se evaluaron las relaciones lípido-péptido 1-10, 1-100 y 1-400, de forma notable los datos obtenidos con la relación 1-400 mostraron la presencia de un efecto similar al de la molécula estándar PmB (Fig. 13A). Esta respuesta se amplió a los LPS de *E. coli*. De manera interesante, bajo las mismas condiciones solamente el tratamiento con VSAK puede favorecer el desplazamiento de la sonda de LPS de los receptores celulares (Fig. 13B). En su conjunto, los experimentos sugieren que el péptido VSAK podría bloquear la interacción de los LPS sobre la superficie celular, de manera que este efecto representa un posible mecanismo de protección.

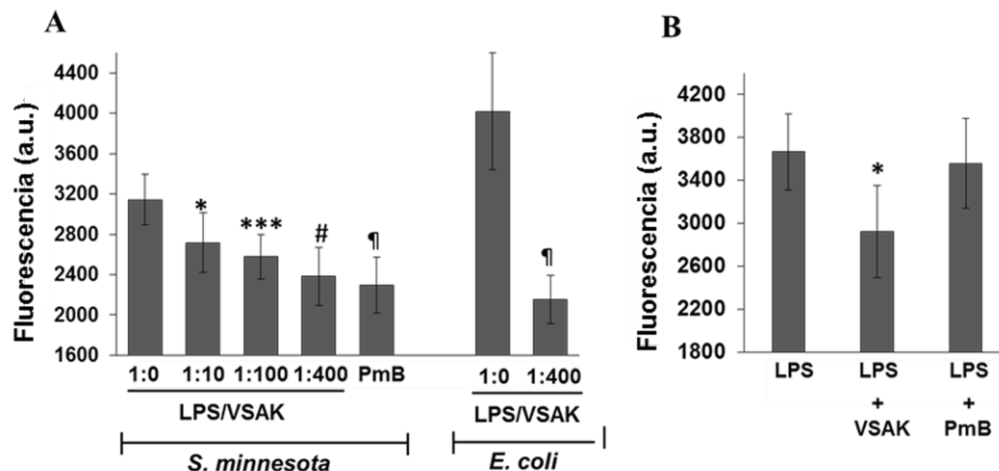


Fig. 13. El tratamiento con el péptido VSAK disminuye la unión de LPS a los receptores celulares. **A)** Inhibición de la unión de los LPS a los receptores bajo el tratamiento con VSAK. Este fenómeno se extiende a LPS de diferentes especies, por ejemplo de *S. minnesota* y *E. coli* 055:B5, ambos acoplados a la sonda Alexa Fluor 488. La PmB fue usada como control. **B)** Desplazamiento de LPS de los receptores de superficie mediado por el péptido VSAK. Se presentan los valores de las medias (n=5, X±SEM), *p<0.1, ***p<0.01, #p<0.005, p¶<0.001 en comparación con el grupo control.

En un estudio paralelo, hemos demostrado que el estímulo con LPS en macrófagos induce la formación de ERO, de manera similar al efecto producido por el péptido β -amiloide [32]. Esta condición de estrés oxidativo induce cambios en la expresión de varias proteínas adaptadoras, que son importantes en la organización de la maquinaria de endocitosis de macrófagos [32]. De esta manera, hemos encontrado que el estrés oxidativo producido por la incubación con LPS (Fig. 14A) se ve disminuido por el tratamiento con el péptido VSAK, esta evidencia se documentó a través de microscopía confocal (Fig. 14B) y el uso del indicador de ERO dihidrofluoresceína diacetato (Fig. 14C).

La expresión de proteínas adaptadoras tales como la β -adaptina, se ve modificada bajo una condición de estrés oxidativo [32], de manera interesante hemos propuesto una nueva función para la proteína β -adaptina en el núcleo, relacionada con la interacción con el factor de transcripción c-myc. Nuevas perspectivas se han discutido acerca de estas proteínas endocíticas [34,35], y β -adaptina podría estar

asociada con la regulación de la función de c-myc, condición que se modifica por el estímulo con LPS en macrófagos, sin embargo este efecto se ve mejorado cuando se lleva a cabo el tratamiento con el péptido VSAK (Fig. 14D). Esta supresión en la interacción de c-myc y β -adaptina es un dato novedoso de nuestro grupo de trabajo, que puede estar relacionado con un mecanismo inicial de daño celular.

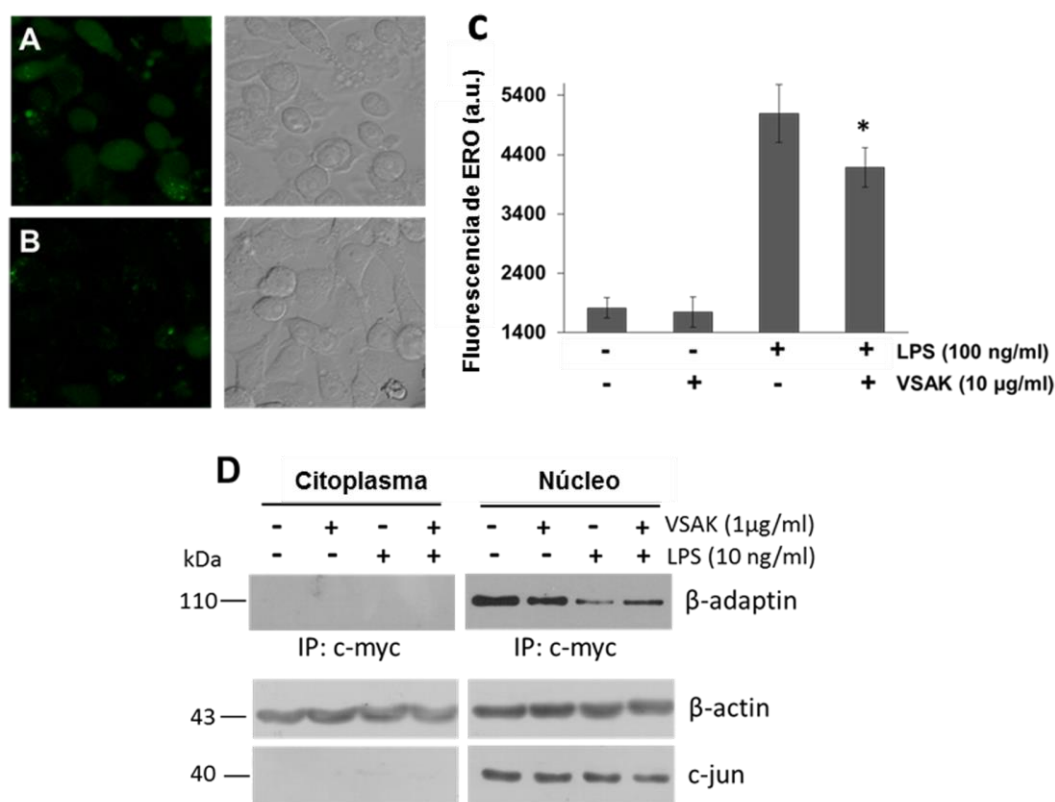


Fig. 14. El tratamiento con el péptido VSAK atenúa la producción de ERO en macrófagos estimulados con LPS, y evita la pérdida de la interacción entre c-myc y β -adaptina en el núcleo. **A)** Identificación de ERO por microscopía confocal bajo el estímulo de 100 ng/mL de LPS durante 4 h. **B)** Efecto de la adición de VSAK (10 μ g/ml) en la formación de ERO. **C)** Producción de ERO evaluada mediante el uso de la molécula dihidrofluoresceína diacetato. Se presentan valores de las medias (n=6, $X \pm DE$), *p<0.05 con respecto al control. **D)** Los macrófagos fueron tratados con LPS (10 ng/ml) y VSAK (1 μ g/mL), la proteína c-myc se inmunoprecipitó, y la β -adaptina se identificó a través de WB. Las proteínas c-jun y β -actina fueron usadas como controles.

Tomando en consideración los resultados obtenidos a través de la experimentación *in vitro* por medio de varios enfoques experimentales, asociados con la caracterización de la unión a LPS de péptidos derivados del C-terminal de CETPI, se ha extendido nuestra propuesta a la evaluación de un potencial efecto protector del péptido VSAK en un modelo *in vivo*.

Experimentación in vivo (conejos)

La evidencia experimental sugiere que el aumento de la temperatura corporal es una respuesta fisiológica temprana a la estimulación con LPS [36-38]. Después de un primer registro de la temperatura, los animales experimentales fueron tratados por vía intravenosa en la oreja marginal con el péptido VSAK (60 µg/kg), y después de 10 min los LPS 0111:B4 (0.3 µg/kg) fueron administrados por la misma vía. La temperatura rectal se registró cada 30 min durante un período de 90 min, los registros indican un menor aumento de temperatura durante todo el intervalo de tiempo en que se llevó a cabo el experimento en el grupo que fue tratado con LPS y el péptido VSAK, en comparación con el grupo que recibió sólo la administración de LPS. De forma interesante, en el grupo que recibió solamente VSAK, no se observó un aumento de la temperatura (Fig. 15A). Las cantidades utilizadas corresponden a una relación LPS-VSAK 1-200, sin embargo se evaluaron otras relaciones como 1-50, 1-100 y 1-400 (datos no mostrados).

Los mejores resultados se obtuvieron con una relación LPS-VSAK 1-200, la cual representa una condición intermedia lípido-péptido, y refuerza la propuesta de una dosis óptima relacionada con una interacción electrostática lípido-péptido a nivel de la interface hidrofílica-hidrofóbica. De la misma forma, otros autores han reportado resultados similares con el uso de secuencias de péptidos antimicrobianos [36]. Sin embargo, tomando en cuenta la naturaleza de la interacción LPS-VSAK, es interesante observar el efecto protector del péptido VSAK en conejos, siendo una secuencia natural, que es relativamente corta y que no induce efectos adversos. Aumentando la

evidencia experimental, los niveles de la citocina proinflamatoria TNF α se encuentran disminuidos en el grupo que recibió el tratamiento con el péptido VSAK (Fig. 15B).

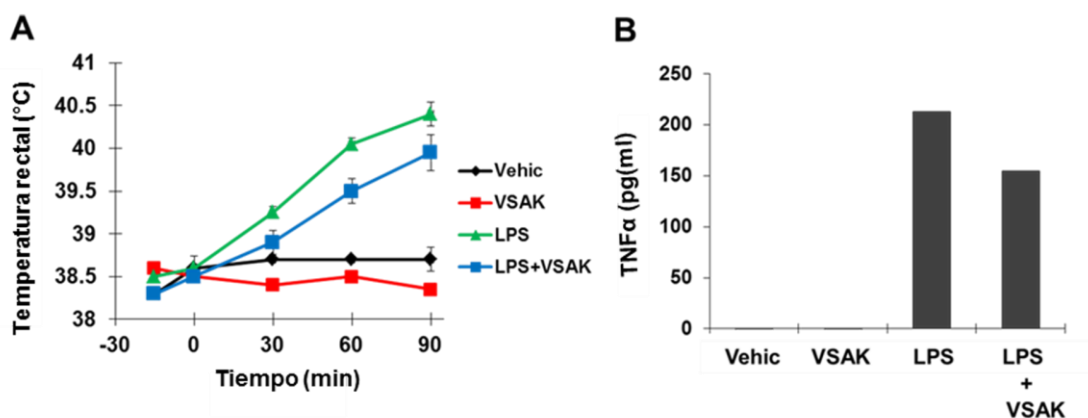


Fig. 15. El péptido VSAK protege del efecto de los LPS en un modelo de choque séptico en conejos. **A)** Evaluación de la temperatura rectal en los grupos experimentales durante un intervalo de 90 min de tratamiento. Se empleó una relación LPS-VSAK 1-200. **B)** Valores de TNF α obtenidos en las distintas condiciones experimentales.

El uso del péptido VSAK tiene algunas ventajas particulares, por ejemplo la unión a diferentes serotipos de LPS y la ausencia de efectos citotóxicos. Aunque VSAK no está involucrado en una actividad bacteriostática o bactericida (datos no mostrados), su función puede estar relacionada con un efecto bloqueador de la citotoxicidad producida por los LPS, y a diferencia de varios AMP que han demostrado inespecificidad, que a su vez puede conducir a la presencia de efectos tóxicos, el péptido VSAK contenido en el extremo C-terminal de CETPI, no induce efectos adversos.

CETPI es una molécula libre que está presente en condiciones fisiológicas normales en el torrente sanguíneo. En contraste, la proteína BPI se encuentra asociada a

gránulos lisosomales en el citoplasma de neutrófilos polimorfonucleares [39], y también se expresa en células epiteliales [40]. El alcance de nuestro trabajo reside en el hecho de que CETPI podría participar en la posible asociación de los LPS a las lipoproteínas, lo que representaría un mecanismo de secuestro del lípido A sobre la interface de las lipoproteínas. Esto podría explicar la estructura tridimensional general en forma de boomerang y el papel de algunas proteínas transferidoras de lípidos que se ha descrito bajo condiciones específicas pueden participar en la disminución de algunas complicaciones de los LPS.

Analizando el potencial uso de moléculas como VSAK, los resultados obtenidos indican que este péptido presenta una respuesta farmacológica protectora moderada ante el efecto de los LPS, de manera que puede ser base para futuros desarrollos, en donde es necesario realizar una optimización de la secuencia con el objetivo de aumentar la afinidad por los LPS, pero a su vez evitando la aparición de efectos adversos debidos al tratamiento.

En su conjunto, los resultados presentados a lo largo del presente capítulo, han permitido la redacción del artículo “Lipopolysaccharide-binding function determined by the C-terminus domain of CETPI” (Anexo VIII).

Asimismo, con base en los resultados se decidió redactar de manera paralela la patente: “Péptidos derivados del dominio C-terminal de CETPI como moléculas bloqueadoras del efecto citotóxico inducido por lipolisacáridos en septicemia y choque séptico” (Anexo IX). La presente invención divulga un péptido usado como molécula para el tratamiento del choque séptico, así como un sistema para la identificación y cuantificación de la proteína CETPI basado en la técnica de ELISA. El péptido SEQ ID NO: 3 ha mostrado condiciones de protección contra algunos efectos citotóxicos asociados con el choque séptico en modelos *in vitro*, así como en un modelo *in vivo* evaluado en conejos.

6.5 Referencias

- [1] Alonso AL, Zentella-Dehesa A, Mas-Oliva J (2003). Characterization of a naturally occurring new version of the cholesterol ester transfer protein (CETP) from small intestine. *Mol Cell Biochem.* 245:173-182
- [2] Van Amersfoort ES, Van Berkel TJ, Kuiper J (2003). Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin Microbiol Rev.* 16:379-414.
- [3] Schmidtchen A, Malmsten M (2013). Peptide interactions with bacterial lipopolysaccharides. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 18:381-392.
- [4] Huet O, Chin-Dusting JP (2014). Septic shock: desperately seeking treatment. *Clin Sci (Lond)* 126:31-39.
- [5] Singh S, Kalle M, Papareddy P, Schmidtchen A, Malmsten M (2013). Lipopolysaccharide interactions of C-terminal peptides from human thrombin. *Biomacromolecules* 14:1482-1492.
- [6] Bolaños-García VM, Soriano-García M, Mas-Oliva J (1998). Stability of the C-terminal peptide of CETP mediated through an (i, i + 4) array. *Biochim Biophys Acta* 1384:7-15.
- [7] Wang S, Kussie P, Deng L, Tall A (1995). Defective binding of neutral lipids by a carboxyl-terminal deletion mutant of cholesteryl ester transfer protein. Evidence for a carboxyl-terminal cholesteryl ester binding site essential for neutral lipid transfer activity. *J Biol Chem.* 270:612-618.
- [8] Wang S, Wang X, Deng L, Rassart E, Milne RW, Tall AR (1993). Point mutagenesis of carboxyl-terminal amino acids of cholesteryl ester transfer protein. Opposite faces of an amphipathic helix important for cholesteryl ester transfer or for binding neutralizing antibody. *J Biol Chem.* 268:1955-1959.
- [9] García-González V, Gutiérrez-Quintanar N, Mendoza-Espinosa P, Brocos P, Piñeiro A, Mas-Oliva J (2014). Key structural arrangements at the C-terminus domain of CETP suggest a potential mechanism for lipid-transfer activity. *J Struct Biol.* 186:19-27.
- [10] García-González V, Mas-Oliva J (2011). Amyloidogenic Properties of a D/N Mutated 12 Amino Acid Fragment of the C-Terminal Domain of the Cholesteryl-Ester Transfer Protein (CETP). *Int J Mol Sci.* 12:2019-2035.
- [11] García-González V, Mas-Oliva J (2013). Amyloid fibril formation of peptides derived from the C-terminus of CETP modulated by lipids. *Biochem Biophys Res Commun.* 434:54-59.
- [12] García-González V, Gutiérrez-Quintanar N, Mas-Oliva J (2014). Péptidos derivados del dominio C-terminal de CETPI como moléculas bloqueadoras del efecto citotóxico inducido por lipopolisacáridos en septicemia y choque séptico. PCT application number: PCT/MX2014/000087.

- [13] Mas Oliva J, Alonso AL (2010). System for the Quantification of the Cholesterol Ester Transfer Protein in Biological and Synthetic Samples. US patent 7,749,721.
- [14] Mas Oliva J, Alonso AL (2007a). System for the Quantification of the Cholesterol Ester Transfer Protein in Biological and Synthetic Samples. EP patent 1,242,446.
- [15] Mas Oliva J, Alonso AL (2007b). Sistema para la Cuantificación de la Proteína Transferidora de Ésteres de Colesterol en Muestras Biológicas y Sintéticas. MX patent 246,945.
- [16] Toledo-Ibelles P, García-Sánchez C, Avila-Vazzini N, Carreón-Torres E, Posadas-Romero C, Vargas-Alarcón G, Pérez-Méndez O (2010). Enzymatic assessment of cholesterol on electrophoresis gels for estimating HDL size distribution and plasma concentrations of HDL subclasses. *J Lipid Res.* 51:1610-1617.
- [17] Nguyen LT, Haney EF, Vogel HJ. (2011). The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol.* 29:464-473
- [18] Marolda CL, Lahiry P, Vinés E, Saldías S, Valvano MA (2006). Micromethods for the characterization of lipid A-core and O-antigen lipopolysaccharide. *Methods Mol Biol.* 347:237-252.
- [19] Domingues MM, Inácio RG, Raimundo JM, Martins M, Castanho MA, Santos NC (2012). Biophysical characterization of polymyxin B interaction with LPS aggregates and membrane model systems. *Biopolymers* 98:338-344
- [20] Yu B, Wright SD (1996). Catalytic properties of lipopolysaccharide (LPS) binding protein. Transfer of LPS to soluble CD14. *J Biol Chem.* 271:4100-4105.
- [21] Mohanram H, Bhattacharjya S (2014). Resurrecting Inactive Antimicrobial Peptides from Lipopolysaccharide (LPS) Trap. *Antimicrob Agents Chemother.* In press
- [22] Park BS, Song DH, Kim HM, Choi BS, Lee H, Lee JO (2009). The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* 458:1191-1195.
- [23] Lamping N, Hoess A, Yu B, Park TC, Kirschning CJ, Pfeil D, Reuter D, Wright SD, Herrmann F, Schumann RR (1996). Effects of site-directed mutagenesis of basic residues (Arg 94, Lys 95, Lys 99) of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein on binding and transfer of LPS and subsequent immune cell activation. *J Immunol.* 157:4648-4656.
- [24] Eckert JK et al. (2013). The crystal structure of lipopolysaccharide binding protein reveals the location of a frequent mutation that impairs innate immunity. *Immunity* 39:647-660.
- [25] Seelig J (2004). Thermodynamics of lipid-peptide interactions. *Biochim Biophys Acta* 1666:40-50.

- [26] Brandenburg K, Garidel P, Fukuoka S, Howe J, Koch MH, Gutschmann T, Andrä J (2010). Molecular basis for endotoxin neutralization by amphipathic peptides derived from the alpha-helical cationic core-region of NK-lysin. *Biophys Chem.* 150:80-87
- [27] Andrä J, Howe J, Garidel P, Rössle M, Richter W, Leiva-León J, Moriyon I, Bartels R, Gutschmann T, Brandenburg K (2007). Mechanism of interaction of optimized Limulus-derived cyclic peptides with endotoxins: thermodynamic, biophysical and microbiological analysis. *Biochem J.* 406:297-307.
- [28] Pulido D, Nogués MV, Boix E, Torrent M (2012) Lipopolysaccharide neutralization by antimicrobial peptides: a gambit in the innate host defense strategy. *J Innate Immun.* 4:327-336.
- [29] Gutiérrez-Quintanar N, García-González V, Mas-Oliva J (2014). New Peptides and Proteins with Binding Capacity to Lipopolysaccharides as a Potential Therapeutic Agents Against Septic Shock. Mexican National Academy of Medicine. In press.
- [30] Hagar JA, Powell DA, Aachoui Y, Ernst RK, Miao EA (2013). Cytoplasmic LPS activates caspase-11: implications in TLR4-independent endotoxic shock. *Science* 341:1250-1253.
- [31] Kayagaki N et al. (2013). Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. *Science* 341:1246-1249.
- [32] Manzano-León N, Delgado-Coello B, Guaderrama-Díaz M, Mas-Oliva J (2006). Beta-adaptin: key molecule for microglial scavenger receptor function under oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 351:588-594.
- [33] Montano EN, Boullier A, Almazan F, Binder CJ, Witztum JL, Hartvigsen K (2013). Development and application of a nonradioactive binding assay of oxidized low-density lipoprotein to macrophage scavenger receptors. *J Lipid Res.* 54:3206-3214.
- [34] Sigismund S, Confalonieri S, Ciliberto A, Polo S, Scita G, Di Fiore PP (2012). Endocytosis and signaling: cell logistics shape the eukaryotic cell plan. *Physiol Rev.* 92:273-366.
- [35] Hupalowska A, Miaczynska M (2012). The new faces of endocytosis in signaling. *Traffic* 13:9-18.
- [36] Gonzalo S, Grasa L, Fagundes DS, Arruebo MP, Plaza MÁ, Murillo MD (2010). Intestinal effects of lipopolysaccharide in rabbit are mediated by cyclooxygenase-2 through p38 mitogen activated protein kinase. *Eur J Pharmacol.* 648:171-178.
- [37] Nguyen HB et al (2006). Severe sepsis and septic shock: review of the literature and emergency department management guidelines. *Ann Emerg Med.* 48:28-54.
- [38] Shibata M, Uno T, Riedel W, Nishimaki M, Watanabe K (2005). Transiently enhanced LPS-induced fever following hyperthermic stress in rabbits. *Int J Biometeorol.* 50:67-74.

[39] Levy O (2000). Antimicrobial proteins and peptides of blood: templates for novel antimicrobial agents. *Blood* 96:2664-2672.

[40] Canny G, Levy O, Furuta GT, Narravula-Alipati S, Sisson RB, Serhan CN, Colgan SP (2002). Lipid mediator-induced expression of bactericidal/ permeability-increasing protein (BPI) in human mucosal epithelia. *Proc Natl Acad Sci.* 99:3902-3907.

7. Conclusiones

La presente tesis muestra el resultado de una serie de hallazgos que nos han permitido entender de una mejor manera el funcionamiento de la proteína CETP y la isoforma CETPI. Considerando que alteraciones en segmentos específicos de las proteínas, determinadas a su vez por modificaciones en la secuencia o a nivel de la estructura secundaria pueden favorecer cambios en la función proteica, y bajo condiciones específicas conducir a un plegamiento anómalo. A través de nuestro trabajo usando como modelo a las proteínas CETP y CETPI con un enfoque en los dominios C-terminal, hemos podido concluir lo siguiente:

- ✓ Por medio de la caracterización estructural y funcional sobre el dominio C-terminal de CETP se registró la presencia de un fenómeno de ordenamiento de lípidos acoplado a una reducción en el tamaño de las partículas de lípidos evaluadas, condición que también se encontró en la proteína CETP completa. Este fenómeno de micelización a partir de partículas grandes y heterogéneas hacia partículas de menor tamaño y con un alto grado de homogeneidad podría llevarse a cabo debido a la capacidad de CETP, a través del dominio anfipático C-terminal, de promover un desplazamiento del equilibrio y optimizar la posibilidad de la unión y transferencia de lípidos a través de un medio acuoso.
- ✓ Utilizando la mutación D₄₇₀N en el C-terminal de CETP, se demostró que una condición que puede modular la estructura secundaria de este dominio está relacionada con su microambiente lípidico. Mediante la incubación con un amplio rango de concentraciones por arriba de la cmc, el ácido lisofosfatídico y en menor medida la lisofosfatidilcolina, promueven un cambio hacia estructuras α -helicoidales y previenen la formación de fibras amiloides en el péptido hélice-Z.

- ✓ El control de los cambios conformacionales en sitios específicos de proteínas determinados por lípidos, podría considerarse como base para el diseño de moléculas que mantengan o estabilizen el estado nativo de las proteínas.
- ✓ El tipo de organización molecular descrito en nuestro estudio llevado a cabo por el dominio C-terminal de CETP siguiendo transiciones estructurales desorden-orden y controladas por la presencia de lípidos específicos, podría considerarse como un ejemplo de switch molecular.
- ✓ El estudio de la proteína CETPI ha permitido identificar y caracterizar su función, en dónde el sitio crítico para la unión a lipopolisacáridos está circunscrito al dominio C-terminal, región en donde reside la diferencia con respecto a CETP.
- ✓ Mediante la experimentación *in vitro*, el péptido VSAK derivado de los últimos 18 residuos del dominio C-terminal de CETPI se mantiene con una estructura secundaria desordenada, la cual no es modulada por lípidos. Sin embargo, el péptido VSAK puede interactuar con varios serotipos de lipopolisacáridos a nivel del lípido A, función que está determinada por un componente electrostático en la superficie, lo que a su vez induce un un rearrreglo en la conformación de los lipopolisacáridos.
- ✓ A través de la unión a lipopolisacáridos, el péptido VSAK bloquea la interacción de estos lípidos a sus receptores blanco los que a su vez desencadenan la respuesta inflamatoria. De esta manera, el péptido VSAK podría mantener en una forma inactiva a los lipopolisacáridos, lo cual favorece una reducción de los efectos citotóxicos de estas moléculas en macrófagos. De igual forma, el tratamiento con el péptido VSAK en un modelo *in vivo* de choque séptico, favorece la presencia de condiciones de protección ante los efectos tóxicos inducidos por los lipopolisacáridos.

8. Perspectivas

Aunque se ha realizado un esfuerzo considerable para entender la correlación entre la estructura y la función de las proteínas CETP y CETPI, aún quedan varias interrogantes importantes de considerar.

- ✓ Con respecto a los resultados obtenidos con CETP, es importante considerar que nuestra propuesta de un mecanismo de ordenamiento de lípidos mediado por el dominio C-terminal podría extenderse al uso de lipoproteínas purificadas.
- ✓ Una de las líneas de investigación que actualmente se está llevando a cabo activamente en nuestro grupo de trabajo está relacionado con la vacuna contra CETP. Considerando que se dispone del número de solicitud PCT, ya se tiene el diseño experimental para la realización de un enfoque similar a los tratamientos aplicados en conejos, pero ahora en un mamífero de mayor tamaño, como lo es el cerdo. En este sentido, tomando en cuenta condiciones similares usadas en los conejos (dosis, dieta y duración del tratamiento), se va a realizar el experimento en 16 cerdos divididos en 4 grupos. Con base en los resultados que se obtengan, el siguiente paso implica la obtención de los permisos correspondientes por la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios para continuar con una fase preclínica y clínica 1 en el humano.

Asimismo, en relación al estudio de CETPI y el uso de péptidos derivados del C-terminal como tratamiento para el choque séptico inducido por LPS en conejos, este debe de ser complementado de la siguiente manera:

- ✓ Evaluar un rango más amplio de concentraciones de LPS y tiempos de exposición más altos considerando condiciones crónicas.
- ✓ Un parámetro que es crítico está relacionado con la optimización de secuencias de péptidos, de manera que se plantea el estudio de péptidos en los que la carga

electrostática positiva sea más alta, de igual forma el uso de un rango más amplio de concentraciones, y la administración de varias dosis.

- ✓ Dentro de este modelo de choque séptico en conejos, aún faltan evaluar otros parámetros que han sido ampliamente reportados y que se encuentran modificados con la administración de LPS. De esta manera, se deberá evaluar la concentración de citocinas (IL-1 β , IL-6), y moléculas como especies reactivas de oxígeno, óxido nítrico, eicosanoides y ácido araquidónico. Todo esto con la finalidad de tener una caracterización más amplia del fenómeno patológico que ejercen los lipopolisacáridos, y el efecto del tratamiento con péptidos derivados de CETPI.
- ✓ De igual forma, se debe ampliar el estudio del mecanismo de acción del péptido VSAK, ya que podría ejercer un efecto protector a través de facilitar la unión de los LPS a las lipoproteínas plasmáticas, lo que representaría un posible mecanismo de secuestro de la parte tóxica de los LPS sobre la interface de las lipoproteínas.

Anexos

I. Publicación: Key structural arrangements at the C-terminus domain of CETP suggest a potential mechanism for lipid-transfer activity. García-González V, Gutiérrez-Quintanar N, Mendoza-Espinosa P, Brocos P, Piñeiro A, Mas-Oliva J (2014). *J Struct Biol.* 186, 19-27.



Key structural arrangements at the C-terminus domain of CETP suggest a potential mechanism for lipid-transfer activity



Victor García-González^a, Nadia Gutiérrez-Quintanar^a, Paola Mendoza-Espinosa^a, Pilar Brocos^b, Ángel Piñeiro^b, Jaime Mas-Oliva^{a,c,*}

^a Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, D.F., Mexico

^b Departamento de Física Aplicada, Facultad de Física, Universidad de Santiago de Compostela, Spain

^c División de Investigación, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 December 2013

Received in revised form 4 February 2014

Accepted 10 February 2014

Available online 14 February 2014

Keywords:

CETP

C-terminus domain

Lipid ordering

Secondary structure transitions

Lipid micelles

ABSTRACT

The cholesteryl-ester transfer protein (CETP) promotes cholesteryl-ester and triglyceride transfer between lipoproteins. We evaluated the secondary structure stability of a series of small peptides derived from the C-terminus of CETP in a wide range of pH's and lipid mixtures, and studied their capability to carry out disorder-to-order secondary structure transitions dependent of lipids. We report that while a mixture of phosphatidylcholine/cholesteryl-esters forms large aggregated particles, the inclusion of a series of CETP carboxy-terminal peptides in a stable α -helix conformation, allows the formation of small homogeneous micelle-like structures. This phenomenon of lipid ordering was directly connected to secondary structural transitions at the C-terminus domain when lysophosphatidic acid and lysophosphatidylcholine lipids were employed. Circular dichroism, cosedimentation experiments, electron microscopy, as well as molecular dynamics simulations confirm this phenomenon. When purified CETP is studied, the same type of phenomenon occurs by promoting the reorganization of lipid from large to smaller particles. Our findings extend the emerging view for a novel mechanism of lipid transfer carried out by CETP, assigning its C-terminus domain the property to accomplish lipid ordering through secondary structure disorder-to-order transitions.

© 2014 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>).

1. Introduction

Several studies focused on the thermodynamic and kinetic analysis of lipid transfer between unilamellar phospholipid vesicles, show that this process is carried out through diffusion of monomers across a water interface. Here, velocity of exchange has been suggested to occur in function of a kinetic model of micellization that allows a semiquantitative prediction of the relative velocity of transfer (Aniansson et al., 1976). When the change in free energy values during lipid desorption from a phospholipid monolayer towards the water interface reach the highest point, the critical transition state corresponds to the last carbon atom to desorb from the monolayer, usually related to a high-energy consumption (Nichols, 1985). Therefore, the kinetic and thermodynamic parameters associated to this phenomenon allow the estimation of transfer efficiency for different lipid molecules (Fig. 1). For instance, cholesterol presents a significant energy barrier opposed to its

desorption from a monolayer with a half-life of transference between two vesicles in the order of two hours, where ΔG_t corresponds to 55 kJ/mol. When the polarity of cholesterol is changed with the addition of a fatty acid, cholesteryl-oleate for example, transfer exceeds the scale of time for most biological processes since the operation would take 10^7 h to occur with a ΔG_t close to 94 kJ/mol. In contrast, the simple addition of a hydroxyl group promotes desorption relatively quickly, as it occurs in the case of 25-hydroxycholesterol, within a transfer time of around 2 min and a ΔG_t of 44 kJ/mol (Mc Lean and Phillips, 1984). From this type of analysis, we can conclude that transfer of neutral lipids through an aqueous phase is a costly biophysical event. Therefore, nature has developed a series of lipid transfer proteins such as CETP with unique structural properties designed to efficiently lower the energy barrier for transfer of cholesteryl-esters through an aqueous environment, not only between lipoproteins but also between the plasma membrane of cells and lipoproteins. Nevertheless, the critical physicochemical characteristics of the process associated to the key structural features of this protein that would explain the extremely efficient lipid transfer process, are still lacking. The

* Corresponding author at: Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, D.F., Mexico. Fax: +52 5556225611.

E-mail address: jmas@ifc.unam.mx (J. Mas-Oliva).

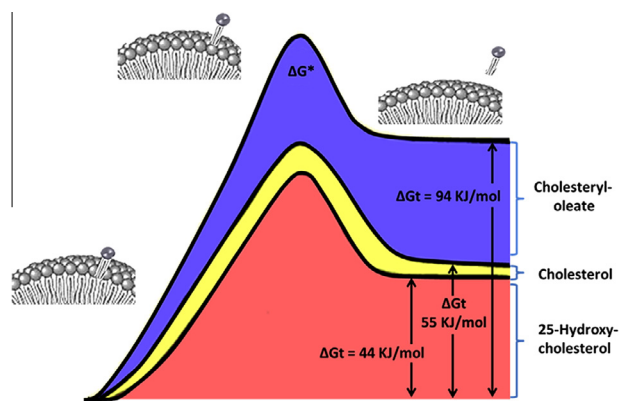


Fig. 1. Free energy diagram for lipid exchange through an aqueous phase. The transfer of lipid molecules from unilamellar phospholipid vesicles to an aqueous phase proceeds through a *transition-state complex*, where an amphipathic lipid molecule is attached to the vesicle through its hydrophobic chain end. The formation of this activated-state complex is associated with a high energy of activation (ΔG^\ddagger), which exceeds the energy of transfer (ΔG_t) by an amount which is determined, in part, by the constraints of the lipid molecule with respect to the surface of the vesicle (modified from [Mc Lean and Phillips, 1984](#)).

present study proposes a new perspective for this process, taking into account that lipid transfer carried out by CETP associated to a minimum entropy change would maintain the thermodynamic equilibrium of the process.

Recently, the crystallographic structure of CETP at 2.2 Å resolution has revealed a 60 Å long tunnel filled with two cholesteryl-ester molecules ([Qiu et al., 2007](#)). Site specific mutagenesis has shown that a rather flexible carboxy-terminal region of CETP structured as an amphipathic α -helix, corresponds to a key region associated with the transfer process ([Wang et al., 1995, 1993](#)). Interestingly, since the boomerang-type concave surface of CETP corresponds to the radius curvature of high density lipoproteins (HDL), the position for the carboxy-terminal α -helix allows its optimal interaction with the surface of this type of lipoproteins through what we consider a corkscrew mechanism ([Xicohtencatl-Cortes et al., 2004a,b](#)). Most probably, the adopted orientation of this helical region is carried out parallel to the surface of HDL particles at the hydrophilic/hydrophobic interface of phospholipids as proposed by us for similar amphipathic helices contained in several human apolipoproteins ([Bolaños-García et al., 1997; Xicohtencatl-Cortes et al., 2004a,b](#)). Since neutral lipids have been suggested to be contained in CETP and the basic principles that allow neutral lipids to reach the core-tunnel have not been solved yet, based on our results we propose a lipid ordering mechanism that allows the formation of micelle-like structures supported by secondary structural transitions at the amphipathic carboxy-terminal region of CETP. This mechanism would allow the movement of lipid through an aqueous interface within accessible thermodynamic parameters.

2. Material and methods

1- α -Phosphatidylcholine (PC), 1-lauroyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholine (lyso-C₁₂PC), 1-hexanoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholine (lyso-C₆PC) and 1-oleoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphate (LPA) were obtained from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). Cholesterol and cholesteryl-esters were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Salts and buffers were purchased from J.T. Baker (Center Valley, PA).

2.1. Peptide synthesis

Peptides with a purity degree greater than 98% were synthesized by GenScript (Piscataway, NJ) and their identity and purity confirmed by mass spectrometry and HPLC analysis. Lyophilized peptides were dissolved in ammonium carbonate buffer (pH 9.5) to a concentration of 1.0 mg/mL. From this solution a further 1:5 dilution was carried out. To evaluate their secondary structure at pH 3.8 and 4.8, a sodium acetate buffer was used; for pH 6.3 and 7.2, a sodium phosphate buffer was used, and for pH's between 8.6 and 9.5, an ammonium carbonate buffer was employed. In all cases, ultrapure MilliQ water was always used together with a filtration step through 0.22 μ m membrane filters. Peptide concentration was determined by measuring the peptide bond absorbance at 205 nm.

Peptide samples at a concentration of 200 μ g/mL were incubated with the different lipid preparations for 12 h at 25 °C before their structural characterization employing circular dichroism, dynamic light scattering and electron microscopy. In the same manner, purified CETP was incubated with the different lipid preparations tested.

Several secondary structure predictors and servers were employed: the PSIPRED protein structure prediction server; Agadir an algorithm to predict the helical content of peptides; SOPMA (self-optimized prediction method with alignment); Protean DNA-Star program and Rosetta Design. Helical wheel representations were obtained using the Protean DNASTar program (Lasergene).

2.2. Circular dichroism (CD) spectroscopy

CD spectra were registered with an AVIV62DS spectropolarimeter (AVIV Instruments) at 25 °C employing far UV wavelengths (190–260 nm). Experiments were performed at a peptide concentration of 200 μ g/mL in a 1 quartz path length cuvette running AVIV software. Spectra were recorded with a 1 mm bandwidth using 0.5 nm increments and 2.5 s accumulation time averaged over 3 scans. CD results are reported as mean molar ellipticity (Θ , deg cm² dmol⁻¹) considering the baseline correction.

2.3. Preparation of lipid mixtures

In order to obtain the desired concentrations of PC and cholesteryl-esters in the different mixtures prepared, lipids were mixed in chloroform and dried for 6 h under a gentle stream of N₂, and an additional period of 24 h in vacuum on a SpeedVac concentrator (Savant). Lipid mixtures were prepared with a molar ratio of PC 2 mM and cholesteryl-ester 100 μ M. After drying, the lipids were resuspended in a phosphate buffer (NaH₂PO₄ 33.3 mM, Na₂HPO₄ 16.6 mM) at pH 6.8, and subsequently sonicated 15 s on/30 s off pulses for 4 cycles of 10 min in an ice bath under a flow of N₂ using a Sonifier 250 ultrasonicator (Branson). Samples were left to equilibrate for 2 h at 25 °C and centrifuged at 13,000 rpm for 10 min before being used.

2.4. Preparation of lyso-C₁₂PC micelles

The required amounts of lyso-C₁₂PC dissolved in chloroform were placed under a gentle stream of N₂ for 6 h, and an additional period of 22 h in vacuum. Samples were resuspended in a phosphate buffer (NaH₂PO₄ 33.3 mM, Na₂HPO₄ 16.6 mM) at pH 6.8 and 37 °C at a final concentration of 25 mM concentration. After this procedure, samples were kept 2 h at 25 °C, subsequently centrifuged at 13,000 rpm for 10 min at 12 °C and left to equilibrate for 2 h before being used.

2.5. Preparation of lysophosphatidic acid (LPA) micelles

The required amounts of LPA dissolved in chloroform were placed under a gentle flow of N₂ for 6 h, and an additional period of 12 h in vacuum. Samples were hydrated in a phosphate buffer (NaH₂PO₄ 33.3 mM, Na₂HPO₄ 16.6 mM) at a final concentration of 12.5 mM and further processed through 4 cycles of freezing in liquid N₂ and thawing at 37 °C. Solutions were kept 2 h at 25 °C and centrifuged for 10 min at 13,000 rpm.

2.6. Purification of CETP from human plasma

CETP was purified using a combination of ultra-centrifugation and several sequential chromatography steps (Ruiz-Noriega et al., 1994). Briefly, lipoprotein free plasma was isolated from freshly drawn human plasma by ultracentrifugation using a TLA 100.4 rotor. The lipoprotein clear fraction was loaded to a phenyl-Sepharose column pre-equilibrated with 4 M NaCl/10 mM Tris/2 mM EDTA pH 7.4. Proteins were eluted in two steps with 150 mM NaCl/10 mM Tris/2 mM EDTA and ultrapure MilliQ water. Fraction eluted with water was applied to an anion exchange column (Q-Sepharose Fast Flow resin) and eluted with a 0–1.0 M NaCl gradient. Finally, the fraction obtained between 720 and 850 mM NaCl was applied to a concanavalin A-Sepharose column where specific CETP elution was achieved using α -methyl-D-mannoside (150 mM).

2.7. Dynamic light scattering (DLS)

DLS sample analysis was performed employing a Malvern Zetasizer Nano System at 25 °C immediately after CD measurements took place. The intensity of dispersed light was measured at an angle of 173°.

2.8. Molecular dynamics simulations

Coarse Grained (CG) simulations were performed with periodic boundary conditions using GROMACS MD engine version 3.3.3 (Van Der Spoel et al., 2005), and carried out in the NPT ensemble. Water and surfactant molecules were separately coupled to a Berendsen thermostat at 300 K with a common period of 1 ps. The pressure was isotropically controlled at 1 bar using a Berendsen barostat (Berendsen et al., 1984) with an isothermal compressibility of $5 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$. The initial coordinates for CETP helix-X¹² were obtained from available X-ray diffraction data (PDB: 2obd) (Qiu et al., 2007). The MARTINI force field (version 2.0) was employed to model all CG molecules (Marrink et al., 2007). As previously proposed by us for coarse grain structures, lipids were parameterized using four beads for the PC head and the first 2–3 CH₂ groups of the surfactant, and one up to three additional hydrophobic beads for the rest of the surfactant tail (Brocos et al., 2012). Random mixtures consisting of 234 CG lipid molecules, 23,415 Martini waters (equivalent to 93,660 atomistic water molecules), 1 CETP helix X¹², and 2Na⁺ ions were introduced in rhombic dodecahedron boxes (edge length 15 nm). Each system was energy minimized using the steepest descent method and then three independent 5 μ s long trajectories per each system performed starting from different initial random velocities. A 1.2 nm cut off was employed for non-bonded interactions. The L–J potential was smoothly shifted to zero between 0.9 and 1.2 nm. A similar approach was employed for electrostatic interactions, considering a Coulombic potential with a relative permittivity of 15 together with a shift function from 0 to 1.2 nm. The neighbor list was updated every 10 steps. The trajectory analysis was performed using tools of the GROMACS package, RasMol 2.7 and Pymol 0.99. More details can be found in a recent study from our group where CG

simulations of micelles were performed using identical methods (Brocos et al., 2012).

2.9. Transmission electron microscopy

Peptides and CETP samples incubated with the different lipid mixtures tested were processed using a negative staining technique and visualized using transmission electron microscopy (NS-TEM). Samples (10 μ L) were placed on carbon-coated copper grids (400 mesh) for 10 min at 25 °C before observations were made. Since in our experience contrast of negative stained samples can be improved by using copper-grids with slightly thicker carbon coatings, according to the color reference chart provided by the company Drukker International, we exposed copper grids to be used for the visualization of the lipid/CETP structures, to carbon vapor for longer periods of time until approximately a thickness of 100 nm was reached. Excess liquid was removed with Whatman paper and grids negatively stained for 5 min with uranyl acetate solution (2% w/v). Samples were dried for 20 min and NS-TEM images were acquired using a JEM-1200EX11 JEOL microscope at 70 kV with a 60,000 \times magnification.

2.10. Lipid/peptide cosedimentation assays and peptide bond spectroscopy

With the objective to evaluate binding of CETP derived peptides to lipid aggregates, cosedimentation experiments were performed using ultracentrifugation with an Optima TLX ultracentrifuge and a TLA-100.2 rotor (Palmer et al., 2009). Samples consisting of peptide, lipid, or peptide/lipid mixtures were centrifuged at 200,000g for 12 h to discard possible liposomal structures. When lyso-C₁₂PC and LPA were used, a further centrifugation step was carried out at 300,000g for 36 h, and 54 h respectively. In all cases 13 °C was maintained throughout the experiments. Supernatants were recovered and the remaining pellets resuspended in a phosphate buffer pH 7.2. Afterwards, absorbance of the supernatants and the remaining resuspended pellets was measured following the absorbance of peptide bonds at 205 and 218 nm.

2.11. Polyacrylamide gradient gel electrophoresis

Pellets obtained from the peptide/lipid cosedimentation assays were analyzed on non-denaturing gradient polyacrylamide gel electrophoresis. Samples were processed using 3–35%, 3–38% and 3–40% polyacrylamide gradients gels using a Tris-borate buffer during 16 h at 80 V. Gradient gels were stained with Coomassie blue G-250 (Toledo-Ibelles et al., 2010).

3. Results

The tridimensional view of the C-terminus region of CETP (aa 453–476) composed of a β -sheet (aa 453–462) and the native amphipathic α -helix (aa 465–476) named helix-X¹² are shown in Fig. 2. When glutamic acid 465 is substituted by a cysteine residue, as it will be shown below, particular secondary structure characteristics are developed with this new model peptide known as helix-Y¹² (Fig. 2A). Peptide helix-Y¹² when placed in solution and incubated at different pH's, maintains most of its α -helical structure within a wide range of pH values (6.3–9.5) when studied by circular dichroism (CD) (Fig. 2B). This situation does not occur when native peptide helix-X¹² is tested, since CD experiments show that secondary structure is lost and the peptide keeps a random conformation independently of pH values (Fig. 2C). The particular characteristics shown by peptide helix-Y¹² constitute a key feature in the development of several patents carried out by

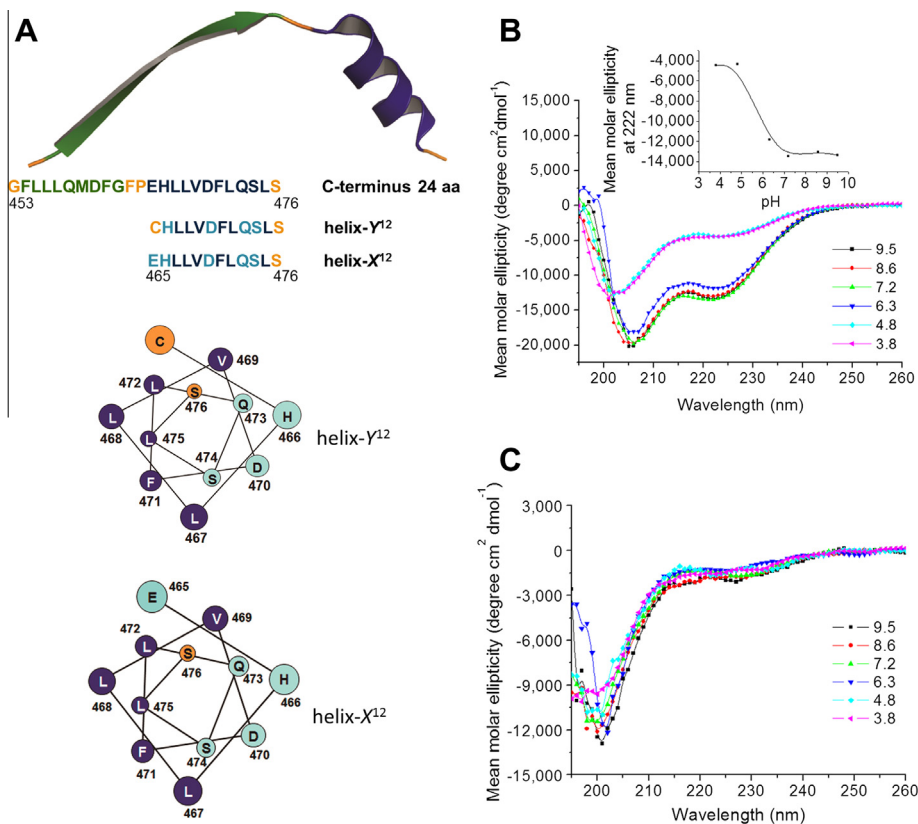


Fig. 2. Structural characterization of peptides derived from the C-terminus of CETP. (A) Primary and secondary structures of the C-terminus region of CETP, showing helical wheel representations for peptide helix-X¹² and for peptide helix-Y¹² (PDB: 2obd); (B) employing CD, pH effect upon secondary structure of peptide helix-Y¹² in the presence of phosphatidylcholine and cholesteryl-esters. Insert shows the change in mean molar ellipticity measured at 222 nm; (C) pH effect upon secondary structure of peptide helix-X¹² in the presence of same lipids.

our group (Mas Oliva et al., 2012; Mas-Oliva and Alonso, 2010, 2007a; Mas Oliva and Alonso, 2007b).

On the other hand, under the same pH range, when a mixture of phosphatidylcholine and cholesteryl-esters are studied by dynamic light scattering (DLS), average aggregates of 30 nm are formed within a range that goes from 20 to 80 nm. This samples when studied by negative staining transmission electron microscopy (NS-TEM) confirmed the size of mostly large aggregates (Fig. 3A and B). It is interesting to observe that when peptide helix-Y¹² is incubated together with the same lipid mixture at pH values close to 7.0, the formation of small homogeneous micelles with an average size of 6 nm is induced (Fig. 3C and D). As previously shown with CD experimentation, extreme pH values interfere with the formation of a well-defined peptide secondary structure and therefore the formation of only large aggregates is observed. This is consistent with previous results from our laboratory showing that electrostatic repulsions and a decrement of intramolecular hydrogen bonds induce the loss of secondary structure in peptides, and therefore aggregation is promoted as an initial step in the formation of amyloid like fibrils (Bolaños-García et al., 1998; García-González and Mas-Oliva, 2011). One of the factors that determine electrostatic repulsion is the net charge of peptides directly related to the pH value of the solution. In this sense, at neutral pH, the net charge of peptide helix-Y¹² is -1.1 , condition that optimally allows peptide interaction with lipid and therefore a complete micellization process takes place. In contrast, when pH 6.3 is tested, as shown in Fig. 3C part of the sample is maintained as large aggregates and part as small micelles. The explanation for this phenomenon is related to the fact that peptide helix-Y¹² at pH 6.3 presents a net charge of -0.6 , far from an optimal condition for peptide/lipid

interaction. pH values close to the isoelectric points of both peptides helix-Y¹² (5.09) and helix-X¹² (4.17) tend to form large aggregates.

Our results show that peptide helix-Y¹² when tested close to physiological pH values, allows the stabilization of the amphipathic carboxy-terminal α -helix and therefore the ability to promote the organization of micelle-like lipid structures. Under the same conditions, although in a smaller degree, peptide helix-X¹² showing a random conformation in solution, in the presence of lipid aggregates is also able to perform the lipid ordering phenomenon (Fig. 3E and F).

When we employ specific lipids such as 12-lysophosphatidylcholine (lyso-C₁₂PC) and lysophosphatidic acid (LPA), known by us to promote the formation of α -helices with amphipathic peptides, peptide helix-X¹² is able to keep a stable α -helical conformation (Figs. 4A and B; 5A and B) and when visualized by NS-TEM also able to promote a lipid ordering effect (Figs. 4C and D; 5C and D). Therefore, for this process to occur, we can conclude that the presence of a well-structured amphipathic α -helix seems to be one of the key factors to achieve the phenomenon described. In order to further characterize peptide/lipid interactions and the fact that peptides promote the micellization process, employing the same concentrations that range from 0 to 40 mM for lyso-C₁₂PC and 0–10 mM for LPA, peptide/lipid cosedimentation assays were performed. Spectroscopy of peptide bonds associated to pellets obtained after ultraspeed centrifugation showed that while peptide helix-X¹² in solution does not sediment, the presence of lipid in solution allows the formation of micelles, and only at this condition peptide sedimentation takes place (Figs. 4E and 5E). When a lower centrifugation speed known to sediment liposome-like

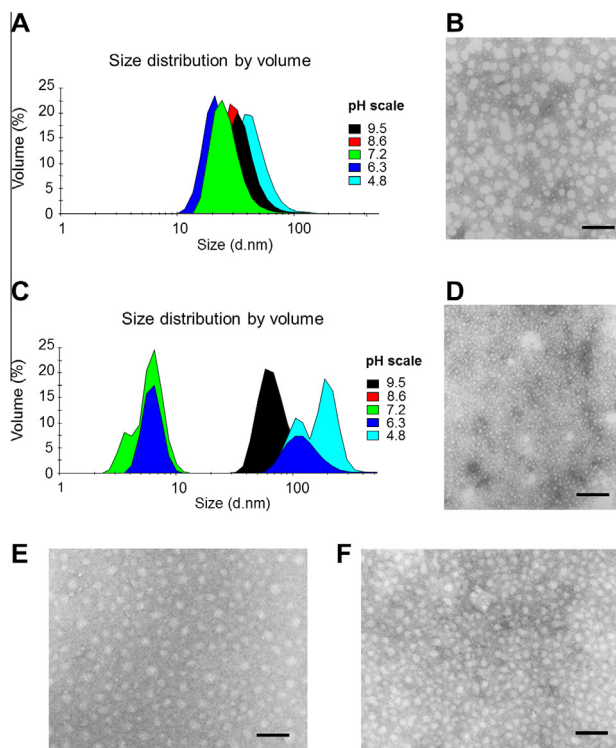


Fig. 3. Formation of micelle-like structures. (A) Particle size distribution of samples composed exclusively of phosphatidylcholine and cholesteryl-esters measured by DLS using a pH range of 4.8–9.5; (B) same lipid sample at pH 7.2 studied by NS-TEM; (C) same lipid mixture plus the addition of peptide helix-Y¹² studied by DLS. Particle size distribution at pH 8.6 not shown since it exactly corresponds to result obtained at pH 9.5; (D) representative image of mixture lipid/helix-Y¹² at pH 7.2 obtained with NS-TEM employing the same experimental conditions; (E) electron microscopy image corresponding to the control mixture of phosphatidylcholine and cholesteryl-esters studied at pH 7.2, and (F) plus the addition of peptide helix-X¹². For every EM image, bar indicates 100 nm.

structures was employed during experimentation with both lipids, either in the absence or the presence of peptide helix-X¹², negligible absorbance values were found associated with the almost non-existent pellets, indicating that the formation of liposomes is not a major factor to consider under the experimental conditions carried out throughout our study (Fig. 4E). Furthermore, non-denaturing polyacrylamide gradient gel electrophoresis support the view that micelle formation, promoted by the presence of peptide helix-X¹², initiates at low lipid concentrations as shown by the presence of bands only when the optimal association between lipid and peptide is achieved (Figs. 4F and 5F).

From these experiments, it is interesting to point out that the micellization process takes place precisely at the point when peptide helix-X¹² presents a structural transition from a disordered state to an α -helix when circular dichroism data is analyzed (Figs. 4A and B; 5A and B). Precisely at this point where secondary structure transitions and lipid ordering take place, the molar relationship between lipids tested and helix-X¹² corresponds to one order of magnitude difference with an average of 35 and 18 molecules of lyso-C₁₂PC and LPA, respectively, associated to one peptide. As shown in Fig. 5F, an increase in LPA concentration does not affect the amount of helix-X¹²/lipid micelles trapped in the gels, indicating that due to the fixed number of peptides placed in solution, practically all peptide units are found associated to lipid micelles independently of the fact that lipid concentration is being increased. Under these conditions, the physicochemical properties shown by the peptide such as high hydrophobicity and high hydrophobic moment (μ H) warranty a strong driving force towards micelle formation.

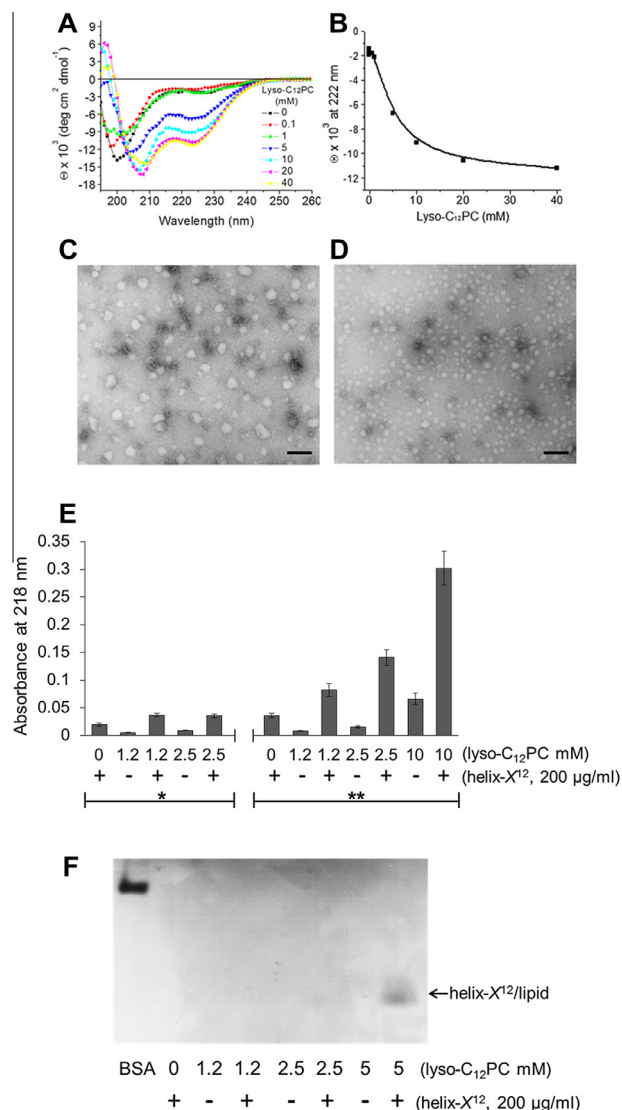


Fig. 4. Lyso-phosphatidylcholine promotes a stable α -helix conformation of peptide helix-X¹². (A) Circular dichroism and secondary structure changes observed in peptide helix-X¹² modulated by the presence of 12-lyso-phosphatidylcholine; (B) mean molar ellipticity values at 222 nm revealed an increase in the α -helix content of peptide helix-X¹²; (C) lyso-phosphatidylcholine aggregates (10 mM) studied by NS-TEM at pH 7.2; (D) effect of the presence of peptide helix-X¹² upon the same lipid mixture. For every EM image, bar indicates 100 nm; (E) lyso-phosphatidylcholine/peptide helix-X¹² cosedimentation assay and peptide bond spectroscopy. Data shown are the mean \pm SEM of 3 experiments. Cosedimentation assays performed at 200,000g for 12 h (*) and 300,000g for 36 h (**); (F) non denaturing polyacrylamide gradient gel electrophoresis of pellets obtained from lyso-phosphatidylcholine/peptide helix-X¹² cosedimentation assays. The 3–38% gel was stained with Coomassie blue G-250.

Taking into account these considerations, molecular dynamics experimentation also allowed us to evaluate the behavior of peptide helix-X¹² in a well controlled lipid environment consisting of a relationship of 234 lipid molecules, \sim 93,700 water molecules and one peptide helix-X¹². As shown in Fig. 6A, the interaction of peptide helix-X¹² with 12-lyso-phosphatidylcholine aggregates promotes the formation of micellar-like structures with an average lower than 70 lipid molecules and one peptide per particle, showing diameters around 5 nm. It is interesting to observe that lipid particles that do not associate with a peptide molecule tend to associate between them, while peptide-associated micelles seem to be stable and stay in solution by themselves. The same lipid ordering phenomenon is observed when 16-lyso-phosphatidylcholine is

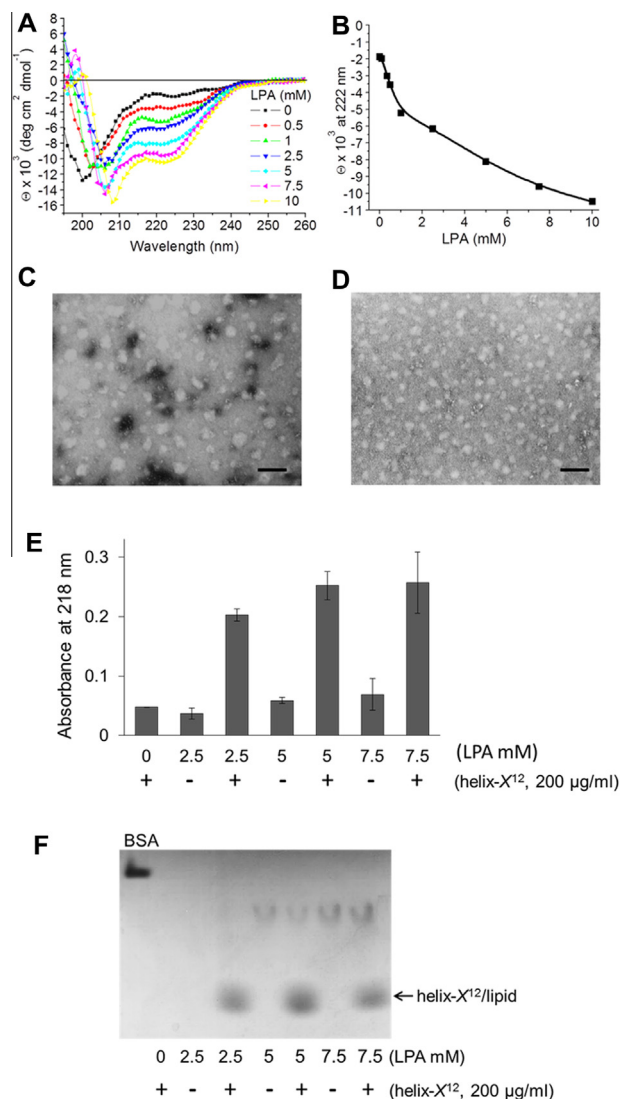


Fig. 5. Lysophosphatidic acid promotes a stable α -helix conformation of peptide helix-X¹². (A) Circular dichroism and secondary structure changes of peptide helix-X¹² modulated by the presence of LPA; (B) mean molar ellipticity values at 222 nm revealed an increase in α -helix content of peptide helix-X¹² while increasing lipid concentration; (C) LPA (10 mM) aggregates studied by NS-TEM at pH 7.2; (D) effect of the presence of peptide helix-X¹² on the same lipid mixture. For every EM image, bar indicates 100 nm; (E) LPA/peptide helix-X¹² cosedimentation assay and peptide bond spectroscopy. Data shown are the mean \pm SEM of 3 experiments. Cosedimentation assays performed at 300,000g for 54 h; (F) non denaturing polyacrylamide gradient gel electrophoresis of pellets obtained from LPA/peptide helix-X¹² cosedimentation assays. The 3–40% gel was stained with Coomassie blue G-250.

employed (Fig. 6B). Lipids such as 6-lysophosphatidylcholine that presents a high cmc shows the tendency to effectively bind to peptide helix-X¹² and organize peptide-associated micelles even before lipid molecules can form micelles by themselves (Fig. 6C). These results provide new evidence and further support the proposal that peptide helix-X¹² located in CETP could facilitate the process of lipid ordering through the formation of micelle-like structures.

From this type of experiments and in order to prove that lipid ordering and the micellization concept might be also carried out by the complete protein, the need to perform a series of experiments employing native CETP became evident. As previously shown with peptides helix-Y¹² and helix-X¹² when incubated in a solution containing lipid aggregates, purified CETP isolated from human plasma (Fig. 7), shows the capability to induce a similar

phenomenon of lipid ordering as shown above for peptides (Fig. 8). We believe, as previously demonstrated by us employing a series of amphipathic peptides derived from several apolipoproteins (Mendoza-Espinosa et al., 2008; Bolaños-García et al., 2001), reordering of lipids from large non-homogenous to smaller more homogeneous particles could be accomplished due to the ability of CETP, through its amphipathic C-terminus domain, to promote an equilibrium shift and optimize the possibility for binding lipids in an aqueous solution.

The results presented in this study employing purified lipids and the use of artificial lipid structures, places us in an optimal position to experiment and better understand now the role for the C-terminus sequence of CETP during lipid transfer amongst human lipoproteins. According to our working hypothesis, present experimentation is being carried out by our group employing isothermal compression of binary Langmuir–Blodgett monolayers (Xicohtencatl-Cortes et al., 2004a,b) and interferometric surface force measurements (Ramos et al., 2008) in order to be able to elucidate and understand, for instance, lipid transfer and the role of surface pressure on HDL particles and its association to local disorder in proteins such as CETP and Lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) (Aguilar-Espinosa et al., 2013).

4. Discussion

Since apparently lipoprotein stabilization is mostly based on a kinetic rather than a thermodynamic process, HDL particles for instance, can be considered unstable particles contained in a kinetic trap (Mehta et al., 2003). Due to this instability, several procedures that include thermal (Sparks et al., 1992) and chaotropic (Mehta et al., 2003) treatment, can easily release the particle from this trap. Our proposal presenting an alternative possibility that would explain the efficient lipid transfer activity carried out by CETP, could take advantage of this fact when the protein binds to an HDL particle releasing the lipoprotein from this kinetic trap (Guha et al., 2008). The release and further stabilization carried out at the surface of an HDL particle could be triggered by HDL lipids when binding around the amphipathic C-terminus domain of CETP. This new structural condition suggests that changes in the curvature present in CETP along its X-axis could be involved with the trigger mechanism that controls binding and release of CETP from the surface of a lipoprotein (Hall and Qiu, 2011; Mendoza-Espinosa et al., 2008), as well as to the phenomenon of HDL remodeling (Maugeais et al., 2013; Niesor et al., 2010).

Although recently Zhang et al. (2012) based on electron microscopy images have proposed that lipid transfer might be carried out through the formation of ternary complexes between two lipoprotein particles and CETP, their interpretation does not take into account the fact that the C-terminus amphipathic α -helix, proven to be essential for the transfer process, is not involved in their model. Moreover, molecular dynamics simulation studies have recently shown that CETP is not able to penetrate further than the phosphate groups of a phospholipid monolayer (Koivuniemi et al., 2012). Also, there is no mention as to how triglycerides and phospholipids together with cholesteryl-esters might be transferred. Although two cholesteryl-ester molecules have been tightly associated to the tertiary structure of CETP, the presence of neutral lipids in the core space of the protein could be directly associated to the maintenance of its structural stability. In this respect, it has been reported that the bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) that shows a potent antimicrobial action and binds to lipopolysaccharides, presents a striking structural similarity with CETP. It is suggested that despite this close similarity, BPI presents a more open structure and a completely different C-terminus sequence in comparison to CETP, phenomenon must probably related

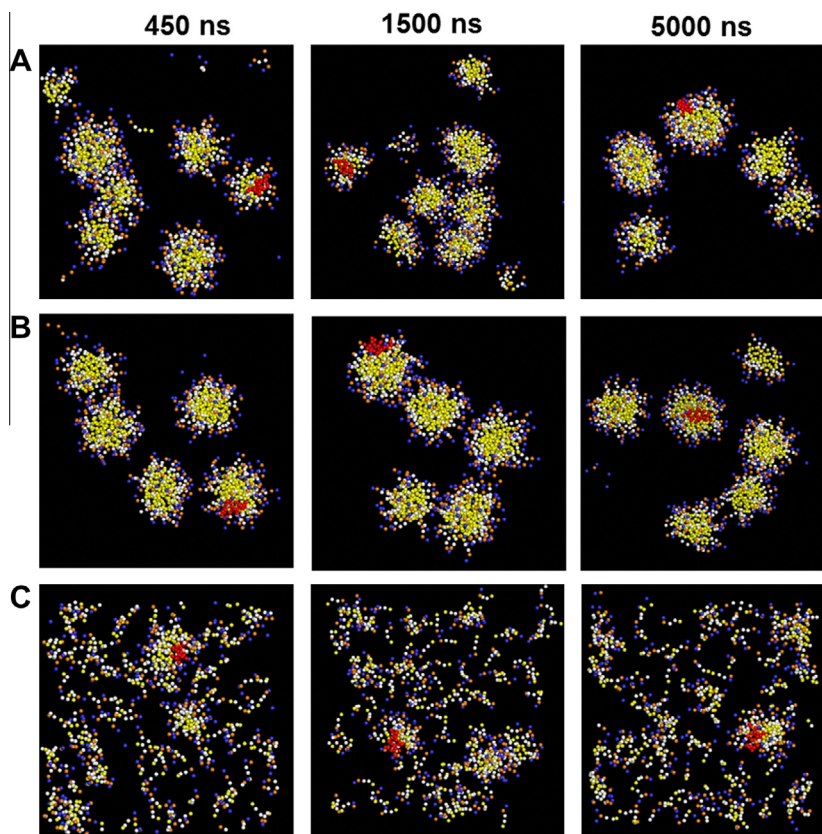


Fig. 6. Molecular dynamics simulations of lipids in the presence of peptide helix- X^{12} . Snapshots were taken at 450, 1500 and 5000 ns. Peptide helix- X^{12} incubated with 12-lysophosphatidylcholine (A), and 16-lysophosphatidylcholine (B). (C) Under incubation with 6-lysophosphatidylcholine monomers, peptide helix- X^{12} promotes de-organization of micelles around itself. Peptide molecules are represented in red and water molecules are not shown for clarity.

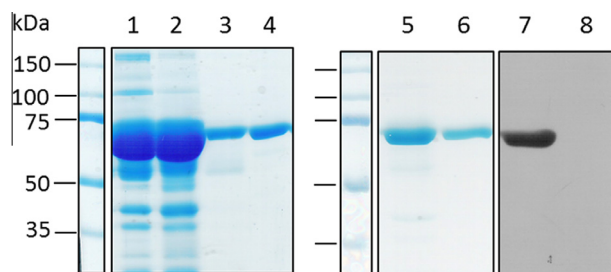


Fig. 7. Purification of CETP from human plasma. (1) Lipoprotein free plasma, (2) hydrophobic interaction chromatography fraction obtained with water elution, (3) anionic-exchange chromatography fraction eluted with a 0–1 M sodium chloride gradient (720–850 mM), (4) bovine serum albumin (BSA), (5) purified CETP, (6) BSA. Lanes (7) and (8) show the Western-blot analysis of fractions 5 and 6, respectively, employing an anti-CETP monoclonal antibody.

to the fact that BPI apparently does not bind cholesteryl-esters (Beamer, 2003). If we take into account that the amphipathic C-terminus α -helix of CETP might be considered as an orienting force region in the same fashion as detergents do (Tanford, 1978), the proposal we describe in this study could support an efficient transference of lipid molecules within energetically suitable parameters.

The presence of conformational transitions associated to the thermodynamics of the process similar to the one described here for the C-terminus domain of CETP, has been documented for other lipid-binding proteins such as apolipoprotein A-1 (Kono et al., 2008; Oda et al., 2003). Since the C-terminus domain of CETP maintains a high intramolecular flexibility with a high factor- B associated to the interaction with lipids, this property must be directly

associated to the type and concentration of specific lipids that would allow or prevent shifts in secondary structure (García-González and Mas-Oliva, 2013; Koivuniemi et al., 2012). For instance, it has been described that LPA at cmc, when placed in contact with β 2-microglobulin, promotes the formation and extension of amyloid fibrils (Pál-Gábor et al., 2009; Ookoshi et al., 2008). However, we found that employing a wide range of concentrations above cmc, LPA and to a lesser extent lysophosphatidylcholine, promote a shift towards α -helical structures and prevent the formation of amyloid fibrils when peptide helix-Z ($D_{470}N$ mutation) derived of the C-terminus domain of CETP is studied (García-González and Mas-Oliva, 2013). Therefore, the control of conformational changes at specific sites of proteins given by specific lipids might be taken as the basis for the design of lipid-like molecules which could maintain or stabilize the native state of proteins prone for aggregation (García-González and Mas-Oliva, 2012).

In conclusion, the type of molecular organization described in our study carried out by the C-terminal segment of CETP following disorder-to-order secondary structure transitions controlled by the presence of specific lipids, in our view might be understood as an example of a molecular switch (García-González and Mas-Oliva, 2013; Mendoza-Espinosa et al., 2009). This would allow CETP to control function under specific metabolic conditions and keep its transfer activity associated to a minimum entropy change related to the formation of micelle-like structures at the C-terminal segment of the protein, process that would dramatically lower the energy barrier for lipid transfer to occur through aqueous media.

Acknowledgments

We thank Blanca Delgado for technical assistance, Rodolfo Paredes for technical support during NS-TEM experimentation

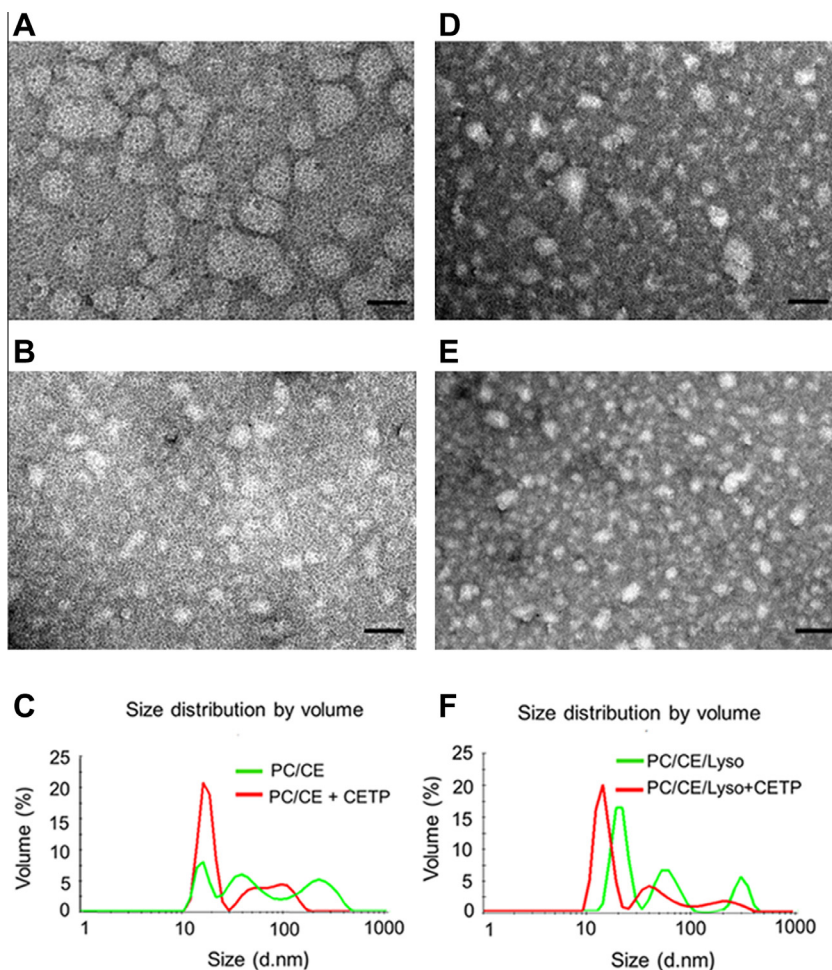


Fig. 8. Lipid reorganization induced by CETP. (A) Lipid aggregates composed of phosphatidylcholine and cholesteryl-esters analyzed by NS-TEM; (B) incubation of the same lipid sample plus the addition of CETP generates better organized lipid particles; (C) particle size distribution of both samples evaluated through DLS; (D) lipid aggregates composed of phosphatidylcholine, cholesteryl-esters (CE) and lysophosphatidylcholine (Lyso); (E) effect of CETP upon the same lipid mixture and (F) samples evaluated by DLS. Protein used at 0.11 μ M and lipids at 12.7 μ M. Bar indicates 100 nm.

and Paola Toledo-Ibelle for help with PAGE. This study was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (CONACyT grant 083673) and DGAPA/UNAM (grant IN205711), both awarded to J.M.-O., V.G.-G., N.G.-Q., P.M.-E. are recipients of a studentship from CONACyT.

References

- Aguilar-Espinosa, S.L., Mendoza-Espinosa, P., Delgado-Coello, B.A., Mas-Oliva, J., 2013. Lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) activity in the presence of Apo-AI-derived peptides exposed to disorder-order conformational transitions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.10.089>.
- Aniansson, E.A.G., Wall, S.N., Almgren, M., Hoffmann, H., Kielmann, I., et al., 1976. Theory of the kinetics of micellar equilibria and quantitative interpretation of chemical relaxation studies of micellar solutions of ionic surfactants. *J. Phys. Chem.* 80, 905–922.
- Beamer, L.J., 2003. Structure of human BPI (bactericidal/permeability-increasing protein) and implications for related proteins. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 791–794.
- Berendsen, H.J.C., Postma, J.P.M., Van Gunsteren, W.F., Dinola, A., Haak, J.R., 1984. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* 81, 3684–3690.
- Bolaños-García, V.M., Ramos, S., Castillo, R., Xicohtencatl-Cortes, J., Mas-Oliva, J., 2001. Monolayers of apolipoproteins at the air/water interfaces. *J. Phys. Chem. B* 105, 5757–5765.
- Bolaños-García, V.M., Soriano-García, M., Mas-Oliva, J., 1998. Stability of the C-terminal peptide of CETP mediated through an (i, i+4) array. *Biochim. Biophys. Acta* 1384, 7–15.
- Bolaños-García, V.M., Soriano-García, M., Mas-Oliva, J., 1997. CETP and exchangeable apoproteins: common features in lipid binding activity. *Mol. Cell. Biochem.* 175, 1–10.
- Brocos, P., Mendoza-Espinosa, P., Castillo, R., Mas-Oliva, J., Piñeiro, Á., 2012. Multiscale molecular dynamics simulations of micelles: coarse-grain for self-assembly and atomic resolution for finer details. *Soft Matter* 8, 9005–9014.
- García-González, V., Mas-Oliva, J., 2013. Amyloid fibril formation of peptides derived from the C-terminus of CETP modulated by lipids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 434, 54–59.
- García-González, V.G., Mas-Oliva, J., 2012. El Concepto de Enfermedad Asociado a la Conformación de Proteínas, first ed. Universidad Nacional Autónoma de México and El Manual Moderno, México.
- García-González, V., Mas-Oliva, J., 2011. Amyloidogenic properties of a D/N mutated 12 amino acid fragment of the C-terminal domain of the cholesteryl-ester transfer protein (CETP). *Int. J. Mol. Sci.* 12, 2019–2035.
- Guha, M., Gao, X., Jayaraman, S., Gursky, O., 2008. Correlation of structural stability with functional remodeling of high-density lipoproteins: the importance of being disordered. *Biochemistry* 47, 11393–11397.
- Hall, J., Qiu, X., 2011. Structural and biophysical insight into cholesteryl ester-transfer protein. *Biochem. Soc. Trans.* 39, 1000–1005.
- Koivuniemi, A., Vuorela, T., Kovanen, P.T., Vattulainen, I., Hyvönen, M.T., 2012. Lipid exchange mechanism of the cholesteryl ester transfer protein clarified by atomistic and coarse-grained simulations. *PLoS Comput. Biol.* 8, e1002299.
- Kono, M., Okumura, Y., Tanaka, M., Nguyen, D., Dhanasekaran, P., et al., 2008. Conformational flexibility of the N-terminal domain of apolipoprotein a-I bound to spherical lipid particles. *Biochemistry* 47, 11340–11347.
- Marrink, S.J., Risselada, H.J., Yefimov, S., Tieleman, D.P., De Vries, A.H., 2007. The MARTINI force field: coarse grained model for biomolecular simulations. *J. Phys. Chem. B* 111, 7812–7824.
- Mas Oliva, J., García González, V., Delgado Coello, B.A., Pérez, A., 2012. Fabricación de una Vacuna Terapéutica de Aplicación Nasal contra el Desarrollo de la

- Atherosclerosis y el Hígado Graso. MX patent application number MX/a/2012/007682.
- Mas-Oliva, J., Alonso, A.L., 2010. System for the quantification of the cholesterol ester transfer protein in biological and synthetic samples. US patent 7,749,721.
- Mas-Oliva, J., Alonso, A.L., 2007a. System for the quantification of the cholesterol ester transfer protein in biological and synthetic samples. EP patent 1,242,446.
- Mas Oliva, J., Alonso, A.L., 2007b. Sistema para la Cuantificación de la Proteína Transferidora de Ésteres de Colesterol en Muestras Biológicas y Sintéticas. MX patent 246,945.
- Maugeais, C., Perez, A., von der Mark, E., Magg, C., Pflieger, P., et al., 2013. Evidence for a role of CETP in HDL remodeling and cholesterol efflux: role of cysteine 13 of CETP. *Biochim. Biophys. Acta* 1831, 1644–1650.
- Mc Lean, L.R., Phillips, M.C., 1984. Kinetics of phosphatidylcholine and lysophosphatidylcholine exchange between unilamellar vesicles. *Biochemistry* 23, 4624–4630.
- Mehta, R., Gantz, D.L., Gursky, O., 2003. Human plasma high-density lipoproteins are stabilized by kinetic factors. *J. Mol. Biol.* 328, 183–192.
- Mendoza-Espinosa, P., García-González, V., Moreno, A., Castillo, R., Mas-Oliva, J., 2009. Disorder-to-order conformational transitions in protein structure and its relationship to disease. *Mol. Cell. Biochem.* 330, 105–112.
- Mendoza-Espinosa, P., Moreno, A., Castillo, R., Mas-Oliva, J., 2008. Lipid dependant disorder-to-order conformational transitions in apolipoprotein CI derived peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 365, 8–15.
- Nichols, J.W., 1985. Thermodynamics and kinetics of phospholipid monomer-vesicle interaction. *Biochemistry* 24, 6390–6398.
- Niesor, E.J., Magg, C., Ogawa, N., Okamoto, H., von der Mark, E., et al., 2010. Modulating cholesteryl ester transfer protein activity maintains efficient pre-B-HDL formation and increases reverse cholesterol transport. *J. Lipid Res.* 51, 3443–3454.
- Oda, M.N., Forte, T.M., Ryan, R.O., Voss, J.C., 2003. The C-terminal domain of apolipoprotein A-I contains a lipid-sensitive conformational trigger. *Nat. Struct. Biol.* 10, 455–460.
- Ookoshi, T., Hasegawa, K., Ohhashi, Y., Kimura, H., Takahashi, N., et al., 2008. Lysophospholipids induce the nucleation and extension of beta2-microglobulin-related amyloid fibrils at a neutral pH. *Nephrol. Dial. Transplant.* 23, 3247–3255.
- Pál-Gábor, H., Gombos, L., Micsonai, A., Kovács, E., Pretrik, É., et al., 2009. Mechanism of lysophosphatidic acid-induced amyloid fibril formation of beta (2)-microglobulin in vitro under physiological conditions. *Biochemistry* 48, 5689–5699.
- Palmer, S.M., Playford, M.P., Craig, S.W., Schaller, M.D., Campbell, S.L., 2009. Lipid binding to the tail domain of vinculin: specificity and the role of the N and C termini. *J. Biol. Chem.* 284, 7223–7231.
- Qiu, X., Mistry, A., Ammirati, M.J., Chrnyk, B.A., Clark, R.W., et al., 2007. Crystal structure of cholesteryl ester transfer protein reveals a long tunnel and four bound lipid molecules. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 106–113.
- Ramos, S., Campos-Terán, J., Mas-Oliva, J., Nylander, T., Castillo, R., 2008. Forces between hydrophilic surfaces adsorbed with apolipoprotein AII alpha helices. *Langmuir* 24, 8568–8575.
- Ruiz-Noriega, M., Silva-Cárdenas, I., Delgado-Coello, B., Zentella-Dehesa, A., Mas-Oliva, J., et al., 1994. Membrane bound CETP mediates the transfer of free cholesterol between lipoproteins and membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202, 1322–1328.
- Sparks, D.L., Lund-Katz, S., Phillips, M.C., 1992. The charge and structural stability of apolipoprotein A-I in discoidal and spherical recombinant high density lipoprotein particles. *J. Biol. Chem.* 267, 25839–25847.
- Tanford, C., 1978. The hydrophobic effect and the organization of living matter. *Science* 200, 1012–1018.
- Toledo-Ibelle, P., García-Sánchez, C., Ávila-Vazzini, N., Carreón-Torres, E., Posadas-Romero, C., et al., 2010. Enzymatic assessment of cholesterol on electrophoresis gels for estimating HDL size distribution and plasma concentrations of HDL subclasses. *J. Lipid Res.* 51, 1610–1617.
- Van Der Spoel, D. et al., 2005. GROMACS: fast, flexible, and free. *J. Comput. Chem.* 26, 1701–1718.
- Wang, S., Kussie, P., Deng, L., Tall, A., 1995. Defective binding of neutral lipids by a carboxyl-terminal deletion mutant of cholesteryl ester transfer protein. Evidence for a carboxyl-terminal cholesteryl ester binding site essential for neutral lipid transfer activity. *J. Biol. Chem.* 270, 612–618.
- Wang, S. et al., 1993. Point mutagenesis of carboxyl-terminal amino acids of cholesteryl ester transfer protein. Opposite faces of an amphipathic helix important for cholesteryl ester transfer or for binding neutralizing antibody. *J. Biol. Chem.* 268, 1955–1959.
- Xicohtencatl-Cortes, J., Castillo, R., Mas-Oliva, J., 2004a. In search of new structural states of exchangeable apolipoproteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324, 467–470.
- Xicohtencatl-Cortes, J., Mas-Oliva, J., Castillo, R., 2004b. Phase transitions of phospholipid monolayers penetrated by apolipoproteins. *J. Phys. Chem. B* 108, 7307–7315.
- Zhang, L., Yan, F., Zhang, S., Lei, D., Charles, M.A., et al., 2012. Structural basis of transfer between lipoproteins by cholesteryl ester transfer protein. *Nat. Chem. Biol.* 8, 342–349.

II. Solicitud de patente: Vacuna de aplicación nasal contra el desarrollo de la enfermedad aterosclerótica y el hígado graso

II. Solicitud de patente: Vacuna de aplicación nasal contra el desarrollo de la enfermedad aterosclerótica y el hígado graso

Una parte fundamental para el inicio y el posterior desarrollo de la patente “Vacuna de aplicación nasal contra el desarrollo de la enfermedad aterosclerótica y el hígado graso” ha sido el trabajo previo del laboratorio relacionado con un sistema para la detección y cuantificación de CETP. Asimismo, el trabajo académico de varios artículos publicados ha sido base para su diseño. A continuación se mencionan las generalidades de la invención, la cual cuenta con el registro de solicitud MX/a/2012/007682 ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, así como el registro PCT/MX 2013/000078 de solicitud internacional.

La presente invención consta de una composición vacunal para administración intranasal, que utiliza una preparación de nanopartículas micelares que incluyen un péptido derivado del C-terminal de CETP como inmunógeno (péptido hélice-Y), fosfatidilcolina, lisofosfolípidos, así como lípidos membranales de la arqueobacteria *Thermus aquaticus* como una mezcla promotora de la respuesta inmune, con el objetivo de bloquear la función de la proteína proaterogénica CETP con un enfoque en el dominio C-terminal.

En el desarrollo de la invención se empleó una formulación que presenta varias ventajas tecnológicas, se produjeron nanopartículas con un tamaño homogéneo y que presentan una alta estabilidad, condiciones en las que se favorece el mantenimiento de la estructura secundaria funcional α -hélice del antígeno, lo cual promueve una respuesta inmunológica dirigida contra el C-terminal de CETP.

En este sentido, la estructura química de los lípidos arqueobacterianos compuesta por grupos alquilo de cadena larga unidos por un enlace éter con el glicerol, es una característica que permite a estas moléculas funcionar como estructuras de andamiaje dentro de las nanopartículas micelares, y que a su vez favorece un aumento en la estabilidad.

Durante la fabricación de la composición vacunal se evaluaron diferentes condiciones como la concentración y la composición de los lípidos. De manera que uno de los aspectos novedosos de la invención es el empleo de la lisofosfatidilcolina, molécula que se ha identificado en el laboratorio favorece la formación y estabilización de la estructura secundaria funcional α -hélice en el antígeno hélice-*Y*. Asimismo, se evaluaron una serie de fosfolípidos, con diferente longitud en las cadenas de ácidos grasos, y modificando las propiedades de carga electrostática en la superficie. Sin embargo, no se registraron cambios en la estructura secundaria del antígeno, únicamente la lisofosfatidilcolina- C_{12} promueve la formación de la estructura α -hélice, la conformación funcional del C-terminal de CETP. Esta caracterización se realizó a través de técnicas como dicroísmo circular, fluorescencia y microscopía electrónica.

Después de haber llevado a cabo una serie de experimentos, se definieron las concentraciones óptimas de los componentes de la invención, quedando de la siguiente manera: fosfatidilcolina 3 mM, lípidos arqueobacterianos 6 mM, lisofosfatidilcolina 2 mM y el antígeno hélice-*Y* 2.9 mM. De esta manera, la relación molar lípido/péptido fue de 3.8/1. De igual forma, se realizaron experimentos en los que se definió y estandarizó la metodología para la fabricación de la vacuna. Considerando las propiedades fisicoquímicas del antígeno, como la hidrofobicidad, el punto isoeléctrico y el momento hidrofóbico, y con el objetivo de evitar la aparición de fenómenos de agregación en la hélice-*Y*, se determinó que la condición óptima que favorece la solubilidad y mantiene al péptido en un estado monomérico a pH 9.5. Por otra parte, considerando la alta concentración de la mezcla de lípidos (11 mM), se evaluaron varias condiciones para la preparación de las nanopartículas micelares, el mejor método fue a través de un secado por 10 h bajo un flujo continuo de N_2 y un proceso de sonicación extensivo, el cual se refiere en la descripción detallada de la invención [MX/a/2012/007682].

En general, durante el desarrollo de esta invención se empleó una formulación que presenta varias ventajas tecnológicas, se produjeron nanopartículas con un tamaño

homogéneo y que presentan una alta estabilidad, en las que se favorece el mantenimiento de la estructura secundaria α -hélice del antígeno, lo cual favorece una respuesta inmunológica dirigida contra el extremo C-terminal de CETP. De forma particular, las características de los lípidos arqueobacterianos permiten tener un sistema que a diferencia de otros adyuvantes induce efectos tóxicos menores, pero a su vez mantiene la estabilidad de la formulación.

La presente invención se evaluó en un modelo de aterosclerosis desarrollado en conejos Nueva Zelanda. Con pesos iniciales de 2.5 kg, los animales se mantuvieron 12 días como período de cuarentena, con dieta normal en el bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Posteriormente, se aplicó una dieta alta en colesterol y triglicéridos (1 y 10 % respectivamente), la cual se mantuvo por 45 días. Durante este intervalo de tiempo, la aplicación de la vacuna se realizó dos veces a la semana.

El hallazgo más importante es que con la dieta alta en lípidos, cuando se lleva a cabo el tratamiento con la vacuna se observó una disminución en el engrosamiento de la túnica íntima de la aorta abdominal, directamente relacionado con una disminución en la formación de la neoíntima y de placas ateroscleróticas. En general, el engrosamiento de la íntima y el área de lesiones de la aorta se redujeron en los grupos tratados con la vacuna al compararlos con las aortas de animales experimentales que no recibieron la administración de la vacuna pero que se mantuvieron con la dieta alta en lípidos. Otra condición importante de la composición vacunal es la protección contra el desarrollo del hígado graso del tipo no alcohólico. Esta protección está relacionada con una disminución en la esteatosis tanto microvesicular como macrovesicular asociada a una disminución en la fibrosis perisinusoidal y perivenular. En su conjunto, los datos sugieren que la inmunización intranasal con nanopartículas micelares, podría disminuir la progresión en la formación de las placas ateroscleróticas.

En conclusión, se desarrolló una composición vacunal de aplicación nasal con nanopartículas micelares compuestas de lípido/hélice-Y, que evaluada en un modelo animal en conejos modula el perfil de lipoproteínas plasmáticas, y puede retardar el

proceso de formación de placas de ateroma en las arterias. Asimismo, los datos sugieren que pueden existir condiciones de protección contra el hígado graso de tipo no alcohólico.

Hasta el momento se cuenta con el número de aplicación de patente mexicana, así como el número de aplicación internacional. De forma interesante, la Universidad Nacional Autónoma de México ha establecido un convenio con la empresa Hamol Biosolutions LLC para continuar con este desarrollo tecnológico.

PCT

PETITORIO

El abajo firmante pide que la presente solicitud internacional sea tramitada con arreglo al Tratado de Cooperación en materia de Patentes.

Para uso de la Oficina receptora únicamente

PCT/MX 2013 / 0 0 0 0 7 8	
Solicitud internacional N°	
(26-06-2013) 26 JUN. 2013	
Fecha de presentación internacional	
SOLICITUD INTERNACIONAL PCT RO/MX	
Nombre de la Oficina receptora: Solicitud Internacional PCT	
Referencia al expediente del solicitante o del mandatario (si se desea) (como máximo, 12 caracteres)	

Recuadro N° I TÍTULO DE LA INVENCION

VACUNA DE APLICACIÓN NASAL CONTRA EL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD ATEROSCLERÓTICA Y EL HÍGADO GRASO

Recuadro N° II SOLICITANTE

Esta persona también es inventor.

Nombre y dirección: (apellido seguido del nombre; si se trata de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección deben figurar el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este recuadro es el Estado de domicilio del solicitante si no se indica más abajo el Estado de domicilio.)

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
9° Piso de la Torre de Rectoría,
Ciudad Universitaria S/N, C.P. 04510
Distrito Federal
MX

N° de teléfono
(52+55) 56 22 63 29

N° de facsímil
(52+55) 56 65 46 44

N° de registro del solicitante en la Oficina

Autorización a utilizar el correo-e. Al marcar una de las casillas que figuran abajo se autoriza a la Oficina receptora, la Administración de búsqueda internacional, la Oficina Internacional y la Administración de examen preliminar internacional a utilizar la dirección de correo-e que se indica en este recuadro para enviar notificaciones relativas a la presente solicitud internacional, si dichas oficinas así lo desean

como copias previas por vía electrónica seguidas de las notificaciones en papel o, por correo electrónico exclusivamente (no se enviará ninguna notificación en papel)

Dirección de correo-e:

Estado de nacionalidad (nombre del Estado):

MX

Estado de domicilio (nombre del Estado):

MX

Esta persona es solicitante para:

todos los Estados designados

los Estados indicados en el recuadro suplementario

Recuadro N° III OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)

Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja de continuación.

Recuadro N° IV MANDATARIO O REPRESENTANTE COMÚN; O DIRECCIÓN PARA LA CORRESPONDENCIA

La persona abajo identificada se nombra/ha sido nombrada para actuar en nombre del/ de los solicitante(s) ante las administraciones internacionales competentes como: mandatario representante común

Nombre y dirección: (apellido seguido del nombre; si se trata de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección deben figurar el código postal y el nombre del país.)

FIGUEROA PÉREZ, Martha
Edificio B, 3er Piso, Zona Cultural
Ciudad Universitaria, C.P. 04510
Distrito Federal
MX

N° de teléfono
(52+55) 56 22 63 29

N° de facsímil
(52+55) 56 65 46 44

N° de registro del mandatario en la Oficina

Autorización a utilizar el correo-e. Al marcar una de las casillas que figuran abajo se autoriza a la Oficina receptora, la Administración de búsqueda internacional, la Oficina Internacional y la Administración de examen preliminar internacional a utilizar la dirección de correo-e que se indica en este recuadro para enviar notificaciones relativas a la presente solicitud internacional, si dichas oficinas así lo desean

como copias previas por vía electrónica seguidas de las notificaciones en papel o, por correo electrónico exclusivamente (no se enviará ninguna notificación en papel)

Dirección de correo-e: marthafp@unam.mx

Dirección para la correspondencia: márchese esta casilla cuando no se nombre/se haya nombrado ningún mandatario o representante común y el espacio de arriba se utilice en su lugar para indicar una dirección especial a la que deba enviarse la correspondencia.

Recuadro N° III OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)

Si no se ha de utilizar ninguno de estos subrecuadros, esta hoja no debe ser incluida en el petitorio.

Nombre y dirección: <i>(apellido seguido del nombre; si se trata de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección deben figurar el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este recuadro es el Estado de domicilio del solicitante si no se indica más abajo el Estado de domicilio.)</i> MAS OLIVA, Jaime Laja 103 Colonia Jardines del Pedregal, C.P. 01900 Distrito Federal MX	Esta persona es: <input type="checkbox"/> solicitante únicamente <input type="checkbox"/> solicitante e inventor <input checked="" type="checkbox"/> inventor únicamente <i>(si se marca esta casilla, no se debe rellenar lo que sigue.)</i>
	N° de registro del solicitante en la Oficina

Estado de nacionalidad <i>(nombre del Estado):</i>	Estado de domicilio <i>(nombre del Estado):</i>
Esta persona es solicitante para: <input type="checkbox"/> todos los Estados designados <input type="checkbox"/> los Estados indicados en el recuadro suplementario	

Nombre y dirección: <i>(apellido seguido del nombre; si se trata de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección deben figurar el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este recuadro es el Estado (es decir, país) de domicilio del solicitante si no se indica más abajo el Estado de domicilio.)</i> DELGADO COELLO, Blanca Alicia 1er Cerrada de Flor Silvestre No. 3, Casa 1° Colonia San Andrés Totoltepec, C.P. 14400 Distrito Federal MX	Esta persona es: <input type="checkbox"/> solicitante únicamente <input type="checkbox"/> solicitante e inventor <input checked="" type="checkbox"/> inventor únicamente <i>(si se marca esta casilla, no se debe rellenar lo que sigue.)</i>
	N° de registro del solicitante en la Oficina

Estado de nacionalidad <i>(nombre del Estado):</i>	Estado de domicilio <i>(nombre del Estado):</i>
Esta persona es solicitante para: <input type="checkbox"/> todos los Estados designados <input type="checkbox"/> los Estados indicados en el recuadro suplementario	

Nombre y dirección: <i>(apellido seguido del nombre; si se trata de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección deben figurar el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este recuadro es el Estado de domicilio del solicitante si no se indica más abajo el Estado de domicilio.)</i> GARCIA GONZALEZ, Víctor Guadalupe Alvaro Obregon No. 118 San Luis Mextepec, C.P. 51355 Estado de México MX	Esta persona es: <input type="checkbox"/> solicitante únicamente <input type="checkbox"/> solicitante e inventor <input checked="" type="checkbox"/> inventor únicamente <i>(si se marca esta casilla, no se debe rellenar lo que sigue.)</i>
	N° de registro del solicitante en la Oficina

Estado de nacionalidad <i>(nombre del Estado):</i>	Estado de domicilio <i>(nombre del Estado):</i>
Esta persona es solicitante para: <input type="checkbox"/> todos los Estados designados <input type="checkbox"/> los Estados indicados en el recuadro suplementario	

Nombre y dirección: <i>(apellido seguido del nombre; si se trata de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección deben figurar el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este recuadro es el Estado de domicilio del solicitante si no se indica más abajo el Estado de domicilio.)</i> PEREZ TORRES, Armando Necaxa 108, B401 Colonia Portales, C.P. 03300 Distrito Federal MX	Esta persona es: <input type="checkbox"/> solicitante únicamente <input type="checkbox"/> solicitante e inventor <input checked="" type="checkbox"/> inventor únicamente <i>(si se marca esta casilla, no se debe rellenar lo que sigue.)</i>
	N° de registro del solicitante en la Oficina

Estado de nacionalidad <i>(nombre del Estado):</i>	Estado de domicilio <i>(nombre del Estado):</i>
Esta persona es solicitante para: <input type="checkbox"/> todos los Estados designados <input type="checkbox"/> los Estados indicados en el recuadro suplementario	

Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en otra hoja de continuación.

Recuadro N° V DESIGNACIONES

Según la Regla 4.9.a), la presentación de este petitorio constituye la designación de todos los Estados contratantes vinculados por el PCT en la fecha de presentación internacional a efectos de todo tipo de protección disponible y, cuando proceda, de la concesión tanto de patentes regionales como de patentes nacionales.

Sin embargo,

- DE Alemania no se designa para ningún tipo de protección nacional
- JP Japón no se designa para ningún tipo de protección nacional
- KR República de Corea no se designa para ningún tipo de protección nacional

(Se puede utilizar las casillas de arriba para excluir (de manera irrevocable) las designaciones en cuestión, a condición de que la solicitud internacional, en la fecha de presentación o ulteriormente según la Regla 26bis.1, reivindique en el Recuadro N° VI la prioridad de una solicitud nacional anterior presentada en el Estado en cuestión, para evitar que, en virtud de la ley nacional, cesen los efectos de esta solicitud anterior).

Recuadro N° VI REIVINDICACIÓN DE PRIORIDAD Y DOCUMENTO DE PRIORIDAD

Se reivindica la prioridad de las siguientes solicitudes anteriores:

Fecha de presentación de la solicitud anterior (día/mes/año)	Número de la solicitud anterior	Si la solicitud anterior es:		
		solicitud nacional: país o miembro de la OMC	solicitud regional: Oficina regional	solicitud internacional: Oficina receptora
Punto (1) 28 Junio 2012 (28-06-2012)	MX/a/2012/007682	MX		
Punto (2)				
Punto (3)				

En el recuadro suplementario se incluyen reivindicaciones de prioridad adicionales

Presentación del (de los) documento(s) de prioridad:

Se pide a la Oficina receptora que prepare y transmita a la Oficina Internacional una copia certificada de la o las solicitudes anteriores (únicamente si esta o estas solicitudes anteriores han sido presentadas en la Oficina que, a los fines de esta solicitud internacional, es la Oficina receptora) indicadas arriba como:

- todos los puntos
- Punto (1)
- Punto (2)
- Punto (3)
- otros, ver recuadro suplementario

Se pide a la Oficina Internacional que obtenga en una biblioteca digital una copia certificada de la o las solicitudes anteriores indicadas arriba, usando el código o los códigos de acceso, si los hay, indicados a continuación (si la Oficina Internacional tiene acceso a esta o estas solicitudes anteriores en una biblioteca digital):

- Punto (1) código de acceso _____
- Punto (2) código de acceso _____
- Punto (3) código de acceso _____
- otros, ver recuadro suplementario

Restaurar el derecho de prioridad: se solicita a la Oficina receptora que restaure el derecho de prioridad respecto a la(s) solicitud(es) anterior(es) indicada(s) más arriba o en el recuadro suplementario como punto(s): (_____). (Véanse también las Notas del Recuadro N° VI; se darán informaciones más amplias que apoyen la petición de restauración del derecho de prioridad).

Incorporación por referencia: cuando un elemento de la solicitud internacional mencionado en el Artículo 11.1)iii)d) o e) o una parte de la descripción, de las reivindicaciones o de los dibujos mencionada en la Regla 20.5.a) no está contenido en otro lugar en esta solicitud internacional pero figura íntegramente en una solicitud anterior cuya prioridad se reivindica en la fecha en la que uno o varios elementos mencionados en el Artículo 11.1)iii) fueron recibidos inicialmente por la Oficina receptora, ese elemento o esa parte, a reserva de confirmación según la Regla 20.6, se incorporará por referencia en esta solicitud internacional a los efectos de la Regla 20.6.

Recuadro N° VII ADMINISTRACIÓN ENCARGADA DE LA BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Elección de la Administración encargada de la búsqueda internacional (si más de una Administración encargada de la búsqueda internacional es competente para efectuar la búsqueda internacional, indíquese el nombre de la Administración elegida; se puede utilizar el código de dos letras):

ISA / ES

Recuadro N° IX LISTA DE VERIFICACIÓN para las presentaciones en PAPEL - esta hoja se emplea exclusivamente para las solicitudes internacionales presentadas en PAPEL

La presente solicitud internacional contiene lo siguiente:	Número de hojas	La presente solicitud internacional va acompañada del(los) siguiente(s) documento(s) (marcar las casillas que procedan e indicar en la columna de la derecha el número de cada documento):	Número de documentos
a) petitorio (PCT/RO/101) (incluidas las hojas de declaración y suplementarias)	4	1. <input type="checkbox"/> hoja de cálculo de tasas	
b) descripción (exceptuando la parte de la descripción reservada a la lista de secuencias (véase el punto f) infra)	48	2. <input type="checkbox"/> poder separado original	
c) reivindicaciones	3	3. <input type="checkbox"/> poder general original	
d) resumen	1	4. <input type="checkbox"/> copia del poder general; número de referencia:	
e) dibujos (en su caso)	9	5. <input type="checkbox"/> documento(s) de prioridad identificado(s) en el Recuadro N° VI como punto o puntos	
f) parte de la descripción reservada a la lista de secuencias (en su caso)		6. <input type="checkbox"/> traducción de la solicitud internacional al (idioma) :	
Número total de hojas:	65	7. <input type="checkbox"/> indicaciones separadas relativas a microorganismos depositados o a otro material biológico	
		8. <input type="checkbox"/> copia en formato electrónico (Anexo C/ST. 25, formato texto,) con soportes lógicos de la lista de secuencias que no forma parte de la solicitud internacional, entregada únicamente a los fines de la búsqueda internacional en virtud de la Regla 13ter (indicar el tipo y el número de soportes lógicos)	
		9. <input type="checkbox"/> una declaración confirmando que "la información registrada en formato electrónico en virtud de la Regla 13ter es idéntica a la lista de secuencias tal como se presentó en papel en la solicitud internacional"	
		10. <input type="checkbox"/> copia de los resultados de búsquedas anteriores (Regla 12bis.1.a)	
		11. <input type="checkbox"/> otros (especifíquese):	

Figura de los dibujos que debe acompañar el resumen: Fig. 12 Idioma de presentación de la solicitud internacional: Español

Recuadro N° X FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL MANDATARIO O DEL REPRESENTANTE COMÚN
 Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio).

~~FIGUERO PÉREZ, Martha~~
 Mandatario

Para uso de la Oficina receptora únicamente

1. Fecha efectiva de recepción de la pretendida solicitud internacional: (26-06-2013) 26 JUN. 2013	2. Dibujos: <input type="checkbox"/> recibidos: <input type="checkbox"/> no recibidos:
3. Fecha efectiva de recepción, rectificada en razón de la recepción ulterior, pero dentro de plazo, de documentos o de dibujos que completen la pretendida solicitud internacional:	
4. Fecha de recepción, dentro de plazo, de las correcciones requeridas según el Artículo 11.2) del PCT:	
5. Administración encargada de la búsqueda internacional especificada por el solicitante: ISA /	6. <input type="checkbox"/> Transmisión de la copia para la búsqueda diferida hasta que se pague la tasa de búsqueda.

Para uso de la Oficina Internacional únicamente

Fecha de recepción del ejemplar original por la Oficina Internacional:



INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL
Dirección Divisinal de Patentes

Solicitud de Patente
 Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad

Solicitud de Registro de Diseño Industrial, especifique cuál:
 Modelo Industrial Dibujo Industrial

Uso exclusivo Delegaciones y Subdelegaciones de la Secretaría de Economía y Oficinas Regionales del IMPI.

Bello

Folio de entrada

Fecha y hora de recepción

Solicitud Expediente: MX/a/2012/007682
Fecha: 29/JUN/2012 Hora: 12:06
Folio: MX/E/2012/049878 491458



Antes de llenar la forma lea las consideraciones generales al reverso

I DATOS DEL (DE LOS) SOLICITANTE(S)

El solicitante es el inventor El solicitante es el causahabiente

1) Nombre (s): UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.
2) Nacionalidad (es): MEXICANA.
3) Domicilio: calle, número, colonia y código postal: 9° PISO DE LA TORRE DE RECTORÍA SIN, CIUDAD UNIVERSITARIA, DELEGACION COYOACÁN, C.P. 04510.
Población, Estado y País: MÉXICO, DISTRITO FEDERAL.
4) Teléfono (clave): 56 22 63 29 AL 31 5) Fax (clave): 56 65 46 44

II DATOS DEL (DE LOS) INVENTOR(ES)

6) Nombre (s): JAME MAS OLIVA, BLANCA ALICIA DELGADO COELLO, VÍCTOR GUADALUPE GARCÍA GONZÁLEZ Y ARMANDO PÉREZ TORRES
7) Nacionalidad (es): MEXICANA, MEXICANA, MEXICANA Y MEXICANA.
8) Domicilio: calle, número, colonia y código postal: LAJA 103 COL. JARDINES DEL PEDREGAL C.P. 01300
Población, Estado y País: DISTRITO FEDERAL, MÉXICO
9) Teléfono (clave): 10) Fax (clave):

III DATOS DEL (DE LOS) APODERADO (S)

11) Nombre (s): LIC. MARTHA FIGUEROA PÉREZ R G P. DDAJ-14762
12) Domicilio: calle, número, colonia y código postal: EDIFICIO "B" 3er. PISO, ZONA CULTURAL DE CIUDAD UNIVERSITARIA, DELEGACIÓN COYOACÁN, C.P. 04510.
Población, Estado y País: MÉXICO, DISTRITO FEDERAL. 14) Teléfono (clave): 56 22 63 29 AL 31 15) Fax (clave): 56 65 46 44
16) Personas Autorizadas para oír y recibir notificaciones: LIC. LAURA CORTÉS SÁNCHEZ, LIC. YESICA MARIBEL CORONEL RIVERA Y LIC. ROCIO JUÁREZ VÁZQUEZ.

17) Denominación o Título de la Invención: "VACUNA DE APLICACIÓN NASAL CONTRA EL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD ATEROSCLERÓTICA Y EL HÍGADO GRASO".

18) Fecha de divulgación previa: Día Mes Año

19) Clasificación internacional: uso exclusivo del IMPI

20) Divisinal de la solicitud: Número Figura jurídica

21) Fecha de presentación: Día Mes Año

22) Prioridad Reclamada: País Fecha de presentación (Día Mes Año) No. de serie

Lista de verificación (uso interno)

No. Hojas		No. Hojas	
<input checked="" type="checkbox"/>	1	<input checked="" type="checkbox"/>	4
<input checked="" type="checkbox"/>	80		
<input checked="" type="checkbox"/>	9		
<input checked="" type="checkbox"/>	1		
<input checked="" type="checkbox"/>	1		
			68
		TOTAL DE HOJAS	

Observaciones:

Bajo protesta de decir verdad, manifiesto que los datos asentados en esta solicitud son ciertos.

LIC. MARTHA FIGUEROA PÉREZ CD. UNIVERSITARIA, D.F. A 29 DE JUNIO DE 2012
Nombre y firma del solicitante o su apoderado Lugar y fecha

III. Reconocimiento: La patente “Vacuna de aplicación nasal contra el desarrollo de la enfermedad aterosclerótica y el hígado graso”, recibió un reconocimiento dentro del programa de fomento al patentamiento y la innovación de la UNAM (2012-2013).

III. Reconocimiento



La Universidad Nacional Autónoma de México



Otorga el presente

RECONOCIMIENTO

A

Mtro. Víctor Guadalupe García González

Por haber participado en el Programa de Fomento al Patentamiento y la Innovación (PROFOPI 2012-2013) y que su desarrollo tecnológico haya destacado por su mérito técnico, su factibilidad, la atractividad de su mercado y su impacto social.

POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU
Ciudad Universitaria, D.F., a 24 de abril de 2014.



Dr. José Narro Robles
Rector

IV. Libro publicado: “El concepto de enfermedad asociado a la conformación de proteínas”

IV. Libro publicado: “El concepto de enfermedad asociado a la conformación de proteínas”

Como parte del trabajo bibliográfico realizado, a continuación se hace mención del prólogo del libro “El concepto de enfermedad asociado a la conformación de proteínas”, publicado de forma conjunta entre la UNAM a través del Programa Universitario de Investigación en Salud (PUIS) y el Manual Moderno, publicado en el año 2012. A continuación se presenta el prólogo del libro.

A lo largo de la evolución, las proteínas han mantenido la tarea de asegurar el funcionamiento metabólico de todo ser vivo. En nuestros días, reconocemos a las proteínas como piezas fundamentales dentro del rompecabezas molecular fundamento de la vida y donde a través de la evolución, todos los sistemas vivos han desarrollado mecanismos moleculares altamente regulados, que por un lado aseguran la adquisición y mantenimiento de su estructura tridimensional funcional, así como su correcto catabolismo al final de su ciclo de uso. Sin embargo, en el ser humano, diversas condiciones patológicas en las cuales aún no se ha descrito una etiología definida, han empezado a encontrar su origen a nivel molecular al relacionar de forma directa diversos cuadros fisiopatológicos con alguna modificación en el plegamiento de las proteínas o en los mecanismos que regulan a este fenómeno bioquímico.

En “El concepto de enfermedad asociado a la conformación de proteínas” hemos abordado una serie de temas que se adentran en la búsqueda y estudio de las modificaciones en el plegamiento de las proteínas y que en nuestros días han empezado a ofrecer una explicación molecular a un importante número de enfermedades. La primer parte de esta obra comprende la descripción de los principios termodinámicos que rigen el plegamiento de las proteínas, realizando una descripción de las principales interacciones moleculares que participan en este proceso. Con cerca de 40 años desde su publicación, sin duda los trabajos de Christian Anfinsen y Cyrus Levinthal siendo pioneros en este campo del conocimiento, aún continúan no solo siendo vigentes, sino

que han dado origen a uno de los campos más dinámicos de investigación en las áreas química, biológica y de la salud.

Por muchos años, la función de las proteínas se ha explicado a través de modelos donde la función de las mismas aparentemente reside en estructuras rígidas perfectamente ordenadas como se enfatiza en el modelo denominado de llave-cerradura, en donde se visualiza a las proteínas como estructuras tridimensionales rígidas. Sin embargo, este concepto ha quedado rebasado a través de una amplia serie de estudios que han demostrado que la función puede emerger de proteínas o dominios específicos contenidos en las mismas sin una estructura tridimensional preestablecida. Actualmente, se reconoce que los organismos filogenéticamente más evolucionados contienen un grupo más numeroso de proteínas que explican su función a través de lo que se puede considerar como desorden estructural. De este modo, diversas líneas de pensamiento las cuales explican la función de las proteínas a través de cambios de estructura del tipo orden/desorden o desorden/orden, han empezado a emerger. En la presente obra, se amplía este concepto para llegar al planteamiento y discusión del papel que puede presentar el plegamiento anómalo de las proteínas en el desarrollo de enfermedad. Algún problema a lo largo de la síntesis o durante la conversión estructural intermedia previa a la adquisición final de una estructura funcional terciaria, es lo que actualmente se empieza a reconocer como enfermedad conformacional. De esta forma, dedicamos un espacio suficiente para describir y analizar a los amiloides, estructuras asociadas con padecimientos como la diabetes mellitus tipo II y algunas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer. Hasta hace pocos años, las llamadas fibras de tipo amiloide, aunque directamente asociadas con estas enfermedades, representaban una entidad estructural poco entendida. Sin embargo, actualmente múltiples estudios han demostrado que estas fibras del tipo amiloide pueden ser una especie común en la naturaleza, y en algunos organismos se ha reportado pueden estar asociadas a funciones fisiológicas normales, sin causar toxicidad.

Hacia el final de la obra, el lector encontrará una sección dedicada a las estrategias farmacológicas y a los estudios a gran escala de genómica y proteómica dirigidos al tratamiento y entendimiento de este tipo de enfermedades. Sin duda, estas herramientas en conexión con el conocimiento estructural y funcional de las proteínas generado día a día, en un plazo corto de tiempo permitirá establecer novedosas estrategias encaminadas al completo entendimiento de los mecanismos moleculares que serán utilizados en el diseño de moléculas para el tratamiento de las enfermedades asociadas con el plegamiento anómalo de las proteínas.

Desde los primeros estudios de difracción de rayos X enfocados en dilucidar la estructura tridimensional de un importante número de proteínas hasta las investigaciones actuales a nivel de proteómica, el estudio de las proteínas ha sido objeto de constantes adelantos en la forma de entender a estas macromoléculas. Con la realización de esta obra, por un lado deseamos contribuir a la difusión de estos novedosos conceptos con potencial impacto en la medicina científica de nuestro país, así como también poner en perspectiva los conceptos y trabajo experimental realizado dentro de esta área de estudio por nuestro grupo de investigación durante los últimos años.



Con apoyo electrónico en Internet

El concepto de enfermedad asociado a la conformación de proteínas

Jaime Mas Oliva
Victor Guadalupe García González

 **Manual Moderno**

 Programa Universitario de Investigación en Salud



Concepto de enfermedad asociado a la conformación de proteínas

Jaime Mas Oliva • Víctor Guadalupe García González



El concepto de enfermedad asociado a la conformación de proteínas



La presente obra obtuvo el “Premio Textos Médicos” edición 2010 que otorga la Academia Nacional de Medicina de México.



El trabajo realizado por los autores plasmado en la presente obra ha sido realizado en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.



EL LIBRO MUERE CUANDO LO FOTOCOPIA

AMIGO LECTOR:

La obra que usted tiene en sus manos posee un gran valor. En ella, su autor ha vertido conocimientos, experiencia y mucho trabajo. El editor ha procurado una presentación digna de su contenido y está poniendo todo su empeño y recursos para que sea ampliamente difundida, a través de su red de comercialización.

Al fotocopiar este libro, el autor y el editor dejan de percibir lo que corresponde a la inversión que ha realizado y se desalienta la creación de nuevas obras. Rechace cualquier ejemplar “pirata” o fotocopia ilegal de este libro, pues de lo contrario estará contribuyendo al lucro de quienes se aprovechan ilegítimamente del esfuerzo del autor y del editor.

La reproducción no autorizada de obras protegidas por el derecho de autor no sólo es un delito, sino que atenta contra la creatividad y la difusión de la cultura.

Para mayor información comuníquese con nosotros:



Editorial El Manual Moderno, S. A. de C. V.

Av. Sonora 206, Col. Hipódromo, 06100
México, D.F.

Editorial El Manual Moderno (Colombia), Ltda

Carrera 12-A No. 79-03/05
Bogotá, D.C.

CeMPro

Centro Mexicano de Protección y Fomento
a los Derechos de Autor
Sociedad de Gestión Colectiva

El concepto de enfermedad asociado a la conformación de proteínas

JAIME MAS OLIVA

Investigador titular del Instituto de Fisiología Celular y
Jefe de la División de Investigación de la Facultad de Medicina,
Universidad Nacional Autónoma de México

VICTOR GUADALUPE GARCÍA GONZÁLEZ

Candidato a Doctor en Ciencias Bioquímicas,
Instituto de Fisiología Celular,
Universidad Nacional Autónoma de México

Editor

Dr. Carlos A. Mendoza Murillo
Editorial El Manual Moderno



Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V.
Av. Sonora 206 Col. Hipódromo, C.P. 06100 México, D.F.

Editorial El Manual Moderno, (Colombia), Ltda
Carrera 12-A No. 79-03/05 Bogotá, DC

Nos interesa su opinión,
comuníquese con nosotros:



Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V.,
Av. Sonora núm. 206,
Col. Hipódromo,
Deleg. Cuauhtémoc,
06100 México, D.F.



(52-55)52-65-11-00



info@manualmoderno.com
quejas@manualmoderno.com

IMPORTANTE

Los autores y la Editorial de esta obra han tenido el cuidado de comprobar que las dosis y esquemas terapéuticos sean correctos y compatibles con los estándares de aceptación general en la fecha de la publicación. Sin embargo, es difícil estar por completo seguro que toda la información proporcionada es totalmente adecuada en todas las circunstancias. Se aconseja al lector consultar cuidadosamente el material de instrucciones e información incluido en el inserto del empaque de cada agente o fármaco terapéutico antes de administrarlo. Es importante, en especial, cuando se utilizan medicamentos nuevos o de uso poco frecuente. La Editorial no se responsabiliza por cualquier alteración, pérdida o daño que pudiera ocurrir como consecuencia, directa o indirecta, por el uso y aplicación de cualquier parte del contenido de la presente obra.

El concepto de enfermedad asociado a la conformación de proteínas

D.R. © 2012 por Universidad Nacional Autónoma de México
ISBN:

Programa Universitario de Investigación en Salud
Ciudad Universitaria, 04510, México, D.F.

En coedición con Editorial El Manual Moderno, SA de CV.
ISBN: 978-607-448-224-9

Miembro de la Cámara Nacional
de la Industria Editorial Mexicana, Reg. núm. 39

Todos los derechos reservados. Ninguna parte de esta publicación puede ser reproducida, almacenada en sistema alguno de tarjetas perforadas o transmitida por otro medio —electrónico, mecánico, fotocopioador registrador, etcétera— sin permiso previo por escrito de la Editorial.

Para mayor información sobre:

- Catálogo de producto
- Novedades
- Distribuciones y más

www.manualmoderno.com



Manual Moderno®

es marca registrada de
Editorial El Manual Moderno S.A. de C.V.

Director editorial y de producción:
Dr. José Luis Morales Saavedra

Editoras asociadas:
Lic. Vanessa Berenice Torres Rodríguez
Lic. Patricia Gamboa Sánchez

Portada:
DG. Betzabel Bojalil

Contenido

Prólogo.....	VII
Introducción.....	IX
Capítulo 1. Consideraciones termodinámicas en el plegamiento de proteínas.....	1
Interacciones de enlace.....	3
Interacciones no covalentes.....	4
Interacciones iónicas.....	4
Teoría fisicoquímica del plegamiento de proteínas.....	5
Capítulo 2. Proteínas intrínsecamente desordenadas.....	11
Descripción de las proteínas desordenadas.....	11
Interacción proteína-RNA.....	14
Proteínas de unión a lípidos. Relación estructura-función.....	17
Proteína p53.....	20
Acercamiento a la relación: proteínas desordenadas y enfermedad.....	21
Capítulo 3. Plegamiento anómalo de proteínas y enfermedad conformacional.....	23
Capítulo 4. Amiloides.....	33
Definición y características.....	33
Formación de amiloides <i>in vitro</i>	36
Asociación de las estructuras amiloides con enfermedad.....	37
Proteína precursora del β -amiloide (PP β A) y el péptido β -amiloide (β A).....	39
Amiloidosis de nervios periféricos y la proteína transtiretina (TTR).....	41

Polipéptido islote-amiloideo (IAPP) y la beta 2 microglobulina ($\beta 2m$).....	42
Priones.....	43
Priones en levadura.....	44
Capítulo 5. Plegamiento de proteínas y evolución.....	49
La fibra amiloide representa una conformación funcional ampliamente extendida.....	52
Capítulo 6. Desorden. Un nuevo enfoque.....	55
Capítulo 7. Estrategias farmacológicas dirigidas al tratamiento de enfermedades asociadas a la conformación de proteínas.....	59
Estabilización del estado nativo.....	59
Reducción de la concentración de especies propensas a la agregación.....	60
Bloqueo de la nucleación y del crecimiento de agregados.....	61
Optimización de los mecanismos de homeostasis celular.....	62
Análisis de las opciones farmacológicas.....	62
Consideraciones en el desarrollo de fármacos.....	64
Índice.....	81

Prólogo

A lo largo de la evolución, las proteínas han mantenido la responsabilidad de asegurar el funcionamiento metabólico de todo ser vivo. En nuestros días, reconocemos a las proteínas como piezas fundamentales dentro del rompecabezas molecular fundamento de la vida y donde a través de la propia evolución, todos los sistemas vivos han desarrollado mecanismos moleculares altamente regulados, que por un lado aseguran la adquisición y mantenimiento de su estructura tridimensional funcional, así como su correcto catabolismo al final de su ciclo de uso. Sin embargo, en el ser humano, diversas condiciones patológicas en las cuales aún no se ha descrito una etiología definida, han empezado a encontrar su origen a nivel molecular al relacionar de forma directa diversos cuadros fisiopatológicos con alguna modificación en el plegamiento de las proteínas o en los mecanismos que regulan a este fenómeno bioquímico.

En "*El concepto de enfermedad asociado a la conformación de proteínas*" hemos abordado una serie de conceptos que se adentran en la búsqueda y estudio sistemáticos de las modificaciones en el plegamiento de las proteínas y que en nuestros días han empezado a ofrecer una explicación molecular a un número importante de enfermedades con orígenes desconocidos. La primer parte de esta obra comprende la descripción de los principios termodinámicos que rigen el plegamiento de las proteínas, realizando una detallada descripción de las principales interacciones moleculares que participan en este proceso. Con cerca de 40 años desde su publicación, sin duda los trabajos de Christian Anfinsen y Cyrus Levinthal siendo pioneros en este campo del conocimiento, aún continúan no solo siendo vigentes, sino que han dado origen a uno de los campos más fértiles de investigación en las áreas química, biológica y de la salud.

Por muchos años, la función de las proteínas se ha explicado a través de modelos donde la función de las mismas aparentemente reside en estructuras rígidas perfectamente ordenadas como se enfatiza en el modelo denominado de cerradura y llave, en donde se visualiza a las proteínas como estructuras tridimensionales rígidas. Sin embargo, este concepto ha quedado rebasado a través de una amplia serie de estudios que han demostrado que la función puede emerger de proteínas o dominios específicos contenidos en las mismas sin una estructura

tridimensional preestablecida. Actualmente se reconoce que los organismos filogenéticamente más evolucionados contienen un numeroso grupo de proteínas que explican su función a través de lo que se puede considerar como desorden estructural. De este modo, diversas líneas de pensamiento las cuales explican la función de las proteínas a través de cambios de estructura del tipo orden/desorden o desorden/orden, han empezado a emerger. En la presente obra, se amplía este concepto para llegar al planteamiento y discusión del papel que puede presentar el plegamiento anómalo de las proteínas en el desarrollo de enfermedad. Algún problema a lo largo de la síntesis o durante la conversión estructural intermedia previa a la adquisición final de una estructura funcional terciaria, es lo que actualmente se empieza a reconocer como enfermedad conformacional. De esta forma por ejemplo, dedicamos suficiente espacio para describir y analizar a los amiloides, estructuras asociadas con padecimientos como la diabetes mellitus tipo II y algunas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer. Hasta hace pocos años, las llamadas fibras de tipo amiloide, aunque directamente asociadas con estas enfermedades, representaban una entidad estructural poco entendida. Actualmente, sin embargo, múltiples estudios han demostrado que estas fibras del tipo amiloide pueden ser una especie común en la naturaleza, y que en algunos organismos se ha reportado pueden estar asociadas a funciones fisiológicas normales, sin causar toxicidad.

Hacia el final de la obra, el lector encontrará una sección dedicada a las estrategias farmacológicas y a los estudios a gran escala de genómica y proteómica dirigidos al tratamiento y entendimiento de este tipo de enfermedades. Sin duda, estas herramientas en conexión con el conocimiento estructural y funcional de las proteínas generado día a día, en un plazo corto de tiempo nos permitirá establecer novedosas estrategias encaminadas al completo entendimiento de los mecanismos moleculares que serán utilizados en el diseño de tratamientos para enfrentar a las enfermedades asociadas con el plegamiento anómalo de las proteínas.

Desde los primeros estudios de difracción de rayos X enfocados en dilucidar la estructura tridimensional de un número importante de proteínas hasta las investigaciones actuales a nivel de proteómica, el estudio de las proteínas ha sido objeto de constantes adelantos en la forma de entender a estas macromoléculas. Con la realización de esta obra, por un lado deseamos contribuir a la difusión de estos novedosos conceptos con potencial impacto en la medicina científica de nuestro país, así como también poner en perspectiva los conceptos y trabajo experimental realizado dentro de esta área de estudio por nuestro grupo de investigación durante los últimos años.

Dr. Jaime Mas Oliva

Dr. Victor Guadalupe García González

V. Premio: *Textos Médicos 2010* que otorga la Academia Nacional de Medicina por “El concepto de enfermedad asociado a la conformación de proteínas.



La presente obra obtuvo el “Premio Textos Médicos” edición 2010 que otorga la Academia Nacional de Medicina de México.



El trabajo realizado por los autores plasmado en la presente obra ha sido realizado en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

VI. Publicación: Amyloid fibril formation of peptides derived from the C-terminus of CETP modulated by lipids. García-González V, Mas-Oliva J (2013). *Biochem Biophys Res Commun.* 434, 54-59



Amyloid fibril formation of peptides derived from the C-terminus of CETP modulated by lipids

Victor García-González^a, Jaime Mas-Oliva^{a,b,*}

^a Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, DF, Mexico

^b División de Investigación, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, DF, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 March 2013

Available online 29 March 2013

Keywords:

CETP

Peptide conformational change

β -Sheet to α -helix transition

Amyloid fibrils

Lysophosphatidic acid

ABSTRACT

Cholesteryl-ester transfer protein (CETP) is a plasmatic protein involved in neutral lipid transfer between lipoproteins. Focusing on the last 12 C-terminus residues we have previously shown that mutation D₄₇₀N promotes a conformational change towards a β -secondary structure. In turn, this modification leads to the formation of oligomers and fibrillar structures, which cause cytotoxic effects similar to the ones provoked by amyloid peptides. In this study, we evaluated the role of specific lipid arrangements on the structure of peptide helix-Z (D₄₇₀N) through the use of thioflavin T fluorescence, peptide bond absorbance, circular dichroism and electron microscopy. The results indicate that the use of micelles formed with lysophosphatidylcholine and lysophosphatidic acid (LPA) under neutral pH induce a conformational transition of peptide helix-Z containing a β -sheet conformation to a native α -helix structure, therefore avoiding the formation of amyloid fibrils. In contrast, incubation with phosphatidic acid does not change the profile for the β -sheet conformation. When the electrostatic charge at the surface of micelles or vesicles is regulated through the use of lipids such as phospholipid and LPA, minimal changes and the presence of β -structures were recorded. Mixtures with a positive net charge diminished the percentage of β -structure and the amount of amyloid fibrils. Our results suggest that the degree of solvation determined by the presence of a free hydroxyl group on lipids such as LPA is a key condition that can modulate the secondary structure and the consequent formation of amyloid fibrils in the highly flexible C-terminus domain of CETP.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

CETP facilitates the transfer of neutral lipids between lipoproteins, and plays an important role in reverse cholesterol transport. The tridimensional view of the C-terminus region of CETP (aa 453–476) is composed of a β -sheet (aa 453–462) and the native amphipathic α -helix (aa 465–476) named helix-X (Fig. 1). Several studies have demonstrated that a critical site for the transfer process is restricted specifically to the 12 residue C-terminus domain structured as an amphipathic α -helix [1–3]. Notwithstanding, our group has reported that this domain shows conformational changes in a non-lipid microenvironment when mutation D₄₇₀N is introduced through the use of peptide denominated helix-Z [4,5]. These conditions give origin to a hydrophobic cluster (⁴⁶⁷LLVNFLQ⁴⁷³) which favors the presence of a β -secondary structure, a mechanism coupled with the formation of oligomers and amyloid fibrils [5]. Employing helix-Z as a model peptide, we have studied the role of several lipid arrangements as potential

modulators of secondary structure and potentially upon amyloid fibril formation.

It has been reported that under specific conditions, lipid molecules induce conformational changes in various amyloid precursor proteins, in addition to the key role in the formation and stabilization of amyloid fibrils [6–8]. Likewise, the interaction between oligomeric precursor species on specific domains of the cell membrane is a primary event that results in the appearance of early cytotoxic effects associated with disease [9,10]. In this case, the role of specific lipid compositions on the hydrophilic/hydrophobic interface must be critical as a recognition site that can modulate possible conformational changes in secondary structure, which in turn could modify the formation of structures controlled by order-to-disorder and disorder-to-order transitions [5–7,9,11]. In this respect, it has been described that molecules such as lysophosphatidic acid (LPA), a phospholipid derived from the enzymatic action of several extracellular phospholipases from precursor molecules such as lysophosphatidylcholine or phosphatidic acid (PA), can promote in the protein β_2 -microglobulin the formation *in vitro* of amyloid fibrils [12,13]. Nevertheless, the route by which the autotaxin enzyme particularly produces a high amount of LPA from lysophosphatidylcholine, is still not well understood [14,15].

* Corresponding author at: Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, DF, Mexico. Fax: +52 55 5622 5611.

E-mail address: jmas@ifc.unam.mx (J. Mas-Oliva).

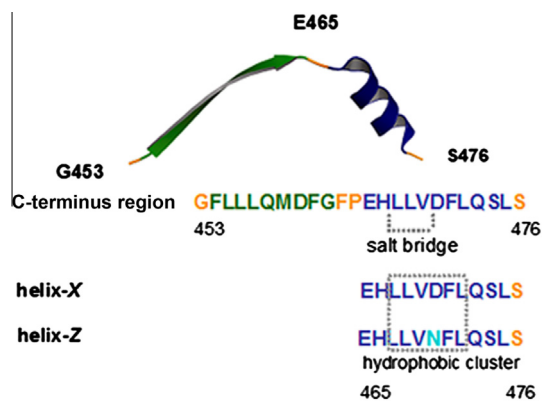


Fig. 1. Structural representation of the C-terminus region of CETP showing sequences of peptides helix-X and helix-Z. The H466-D470 salt bridge and the hydrophobic cluster are shown. The structure was obtained from the Protein Data Bank, access code: 2obd.

In this study, we present a series of experiments which demonstrate that treatment of helix-Z with LPA and lysophosphatidylcholine (lyso- C_{12} PC), lipids that can be found on the surface of lipoproteins, promote a structural change from a β -chain to a native α -helix structure. Incubation of helix-Z with LPA concentrations above 2.5 mM completely inhibits the formation of amyloid fibrils, in a manner that interactions of peptide with specific hydrophilic/hydrophobic interfaces formed by this lipid, should retain peptide monomers at the surface and consequently prevent peptide self-assembly. These conditions might allow helix-Z to recover and maintain the functional α -helix conformation of the C-terminus domain of CETP and therefore warranty protein function.

2. Materials and methods

Cholesterol, cholesteryl-ester, L - α phosphatidic acid dipalmitoyl (PA), L - α -phosphatidylethanolamine dipalmitoyl (PE), L - α -phosphatidylcholine dipalmitoyl (DPPC) and thioflavin T (ThT) were obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO). L - α -Phosphatidylcholine (PC), 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC), 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-1-glycerol (POPG), 1-lauroyl-2-hydroxy-*sn*-glycero-3-phosphocholine (lyso- C_{12} PC) and 1-oleoyl-2-hydroxy-*sn*-glycero-3-phosphate (LPA) were obtained from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL).

2.1. Peptide synthesis and peptide preparation

Helix-Z ($^{465}\text{EHLVDFLQSLSS}^{476}$) and native peptide ($^{465}\text{EHLVDFLQSLSS}^{476}$) derived from the C-terminus of CETP were synthesized by GenScript (Piscataway, NJ) and dissolved in a carbonate buffer pH 9.5 (1 mg/ml). From this solution a further 1:5 dilution was carried out. To evaluate the structure at pH 7.2 in the different lipid environments, a sodium phosphate buffer was also used. Under the same conditions, the control peptide $^{460}\text{DFGFPEHL}^{466}$ was employed. Solutions were filtered through 0.22 μm membrane filters before carrying out the experiments. Purity of peptides was greater than 98% confirmed by mass spectrometry and HPLC analysis. Peptide concentration was determined by measuring the peptide bond absorbance at 205 nm.

Peptide samples at a concentration of 200 $\mu\text{g/ml}$ were incubated with the different lipid preparations for 12 h at 25 $^{\circ}\text{C}$ before their structural characterization, employing circular dichroism, thioflavin T fluorescence, peptide bond spectroscopy and electron microscopy.

2.2. Circular dichroism spectroscopy

Circular dichroism (CD) spectra were recorded with an AVIV 62DS spectropolarimeter (AVIV Instruments) at 25 $^{\circ}\text{C}$ employing far UV wavelength (190–260 nm). Experiments were performed at a peptide concentration of 200 $\mu\text{g/ml}$ in a 1.0 mm quartz path length cuvette, running AVIV software. Spectra were recorded with a 1 mm bandwidth, using 1 nm increments and 2.5 s accumulation time averaged over 3 scans. CD results are reported as mean molar ellipticity (θ , $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$) considering the baseline correction.

2.3. Thioflavin T fluorescence and peptide bond spectroscopy

Employing 180 $\mu\text{g/ml}$ of peptide, the absorbance was measured every 1 nm using a Perkin Elmer UV/Vis Lambda 2S spectrophotometer scanning from 200 to 240 nm. Peptide spectra were corrected by subtracting the corresponding control spectra obtained under identical conditions. Additionally, the β -structure was characterized with ThT fluorescence assay. Fluorescence emission spectra were registered at 25 $^{\circ}\text{C}$ from 470 to 540 nm with an excitation wavelength of 450 nm. A scan velocity of 60 nm/min using an Olis DM45 spectrofluorimeter was used. The concentrations of ThT and peptides were 10 μM and 36 μM , respectively.

2.4. Preparation of micelles formed by phosphatidylcholine/cholesteryl-esters

Lipids were mixed in chloroform and dried for 6 h under a gentle stream of N_2 , and an additional period of 24 h in a SpeedVac concentrator (Savant). Lipid mixtures were prepared with a molar ratio of PC 2 mM and cholesteryl-ester 100 μM (20:1). After drying, lipids were resuspended in pH 6.8 buffer and subsequently sonicated 15 s on/30 s off pulses for 4 cycles of 10 min in an ice bath under a flow of N_2 using a Sonifier 250 ultrasonicator (Branson). Samples were left to equilibrate for 2 h and centrifuged at 13,000 rpm for 10 min before being used.

2.5. Preparation of micelles formed by lyso- C_{12} PC, LPA and PA

The required amounts of lyso- C_{12} PC dissolved in chloroform were placed under a gentle stream of N_2 for 4 h, complete solvent free treatment was achieved by an additional 22 h in a vacuum equipment. Samples were resuspended in a phosphate buffer pH 6.8 at 37 $^{\circ}\text{C}$ (50 mM). Samples were kept 2 h at 25 $^{\circ}\text{C}$ and subsequently centrifuged at 13,000 rpm for 10 min at 12 $^{\circ}\text{C}$.

LPA samples in chloroform were placed under a gentle flow of N_2 for 6 h, and additional 12 h in vacuum equipment. The samples were hydrated in phosphate buffer and afterwards processed through 4 cycles of freezing in liquid N_2 , and thawing at 37 $^{\circ}\text{C}$. Solutions were left to equilibrate for 2 h and centrifuged at 13,000 rpm for 10 min. Under the same experimental conditions, PA vesicles were prepared with an additional step of sonication for 4 cycles of 10 min.

2.6. Preparation of micelles by phospholipids and LPA

PC and LPA were mixed in chloroform and dried for 6 h under a gentle stream of N_2 with an additional treatment using a SpeedVac concentrator 22 h in vacuum. Lipid mixtures were prepared with a molar ratio of PC 3.06 mM and LPA 0.92 mM. After drying, lipid mixture was resuspended in pH 6.8 buffer and subsequently sonicated for 4 cycles. Samples were left to equilibrate for 2 h and centrifuged at 13,000 rpm for 10 min. Employing the same methodology, micelles consisting of DPPC/LPA and PE/LPA were prepared. Under a ratio of POPC 75% and POPG 25%, negatively charged micelles were prepared with the addition of LPA.

2.7. Electron microscopy

Peptide samples incubated under different conditions were processed employing a negative staining technique and visualized using transmission electron microscopy (NS-TEM). Samples (10 μ l) were placed on carbon-coated copper grids (400 mesh) for 10 min at 25 °C. Excessive liquid was removed and the grids were negatively stained with uranyl acetate solution (2%, w/v) for 5 min. Samples were dried for 20 min. NS-TEM images were acquired using a JEM-1200EX11 JEOL microscope at 70 kV with a magnification of 60,000 \times .

3. Results and discussion

Previous studies from our laboratory have shown that peptide helix-Z shows the formation of a β -type secondary structure dependent on pH and peptide concentration [5]. Conditions such as ionic strength did not modify the content of β -structure, and only temperatures above 70 °C promote a decrease in the percentage of this type of secondary structure [5]. In this study we evaluated the effect of several lipid arrangements upon helix-Z structure at pH 7.2 under physiological conditions. Specifically, we conducted a series of experiments by changing regional characteristics

of lipid such as: polar head size, acyl chain length, electrostatic charge and degree of solvation, all of them able to modify the secondary structure of helix-Z.

Treatment with increasing incubation concentrations of lyso-C₁₂PC (0.01–40 mM) showed that lipid concentrations below 5 mM allow helix-Z to maintain a β -sheet conformation when monitored by CD (Fig. 2A). Incubation with 1 mM lyso-C₁₂PC, a concentration close to the critical micelle concentration (0.9 mM) for this lipid, increased values that correspond to a β -structure (Fig. 2A and B). Under this condition, interactions of helix-Z and lyso-C₁₂PC in an aqueous environment must have taken place in a dynamic equilibrium between lipid monomers as well as formed micelles. In this regard, it has been reported that molecules with a similar structure to lyso-C₁₂PC trigger the aggregation phenomenon in amyloidogenic proteins at concentrations equivalent to those used in this study [16]. In our hands, concentrations of lyso-C₁₂PC close to 10 mM induced a transition point between β -sheet structures and the formation of α -helical structures. This change was followed by evaluating the CD characteristics for a β -sheet conformation at 201 nm (Θ_{201nm}) (Fig. 2B). This phenomenon was also studied following changes in peptide bond absorbance at 218 nm (Fig. 2C) and by fluorescence coupled to ThT (Fig. 2D). Under treatment with lyso-C₁₂PC (10 mM), fibrillar structures were still identified in smaller quantities but more extended

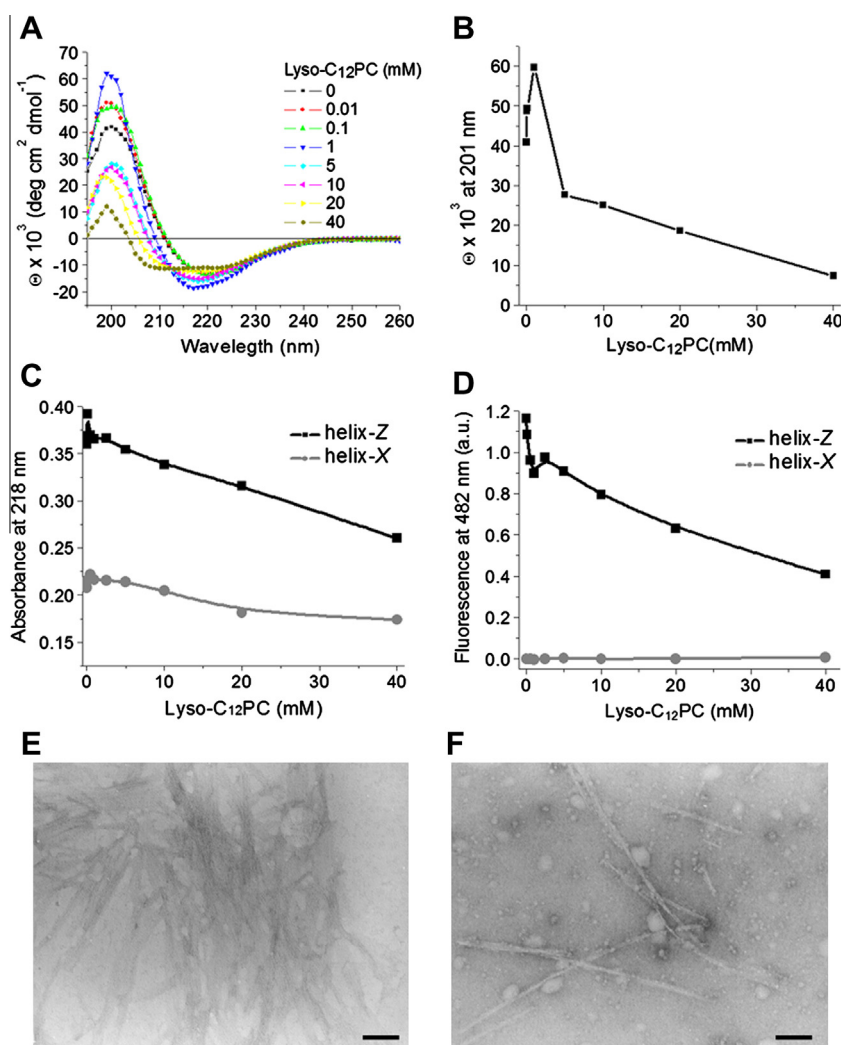


Fig. 2. Effect of lysophosphatidylcholine upon the structure of helix-Z. (A) CD spectra obtained under treatment with increasing concentrations of lyso-C₁₂PC. (B) Mean molar ellipticity values at 201 nm. (C) Under the same conditions, absorbance at 218 nm, (D) fluorescence coupled to ThT at 482 nm. Native peptide was used as control. (E) Amyloid fibrils formed by helix-Z. (F) Helix-Z incubated with lyso-C₁₂PC vesicles (10 mM). Bars correspond to 100 nm.

with respect to helix-Z samples not incubated with lipid (Fig. 2E and F). At higher concentrations of lyso-C₁₂PC (20 and 40 mM), although a residual signal for β -structures was detected following peptide bond absorbance and fluorescence coupled to ThT, CD measurements showed the formation of well-defined α -helix structures.

In another series of experiments, considering that the hydrophobic characteristics of the surrounding microenvironment are key conditions that favor structural changes in specific domains of lipid binding proteins, we evaluated several lipid molecules with structures similar to lyso-C₁₂PC. Using a concentration range between 0.1 and 10 mM LPA, a lipid with a small polar head close to the acyl chain, a series of experiments were carried out and the conformational changes from β -structures to α -helices studied. Spectra obtained showed an isodichroic point near to 215 nm associated with the presence of only two conformational states (Fig. 3A).

CD experiments show that this β to α transition was also identified by plotting the signal at $\Theta_{201\text{nm}}$, where it was found that incubation with concentrations of LPA above 1 mM induces a drastic decrease in CD values associated with the loss of β -structure (Fig. 3B). In parallel, conformational changes were followed recording absorbance of peptide bonds at 218 nm (Fig. 3C) and by measurements of fluorescence coupled to ThT (Fig. 3D).

The present data indicate that LPA induces a well-defined structural transition in secondary structure from β -sheet towards an α -helix at concentrations above its cmc. In fact, after treatment with 2.5 mM LPA, ThT fluorescence was suppressed (Fig. 3D insert), indicating a complete loss of β -structure content. Fibrillar structures were not found in LPA samples analyzed below 10 mM and processed through NS-TEM (Fig. 3F). Our results suggest that conformational changes in secondary structure dependent of LPA are associated with a cooperative process, where helix-Z recovers the levels of an α -helical structure similar to what it is found when the native peptide is studied (Supplementary Fig. 1). However, this might not be considered a general phenomenon for lipids with a free hydroxyl groups at the polar head. At the highest lyso-C₁₂PC concentrations (20 and 40 mM), the fluorescence signal coupled to ThT was not completely abolished; therefore, incubation with lyso-C₁₂PC is associated with a partial transition towards the formation of α -helices.

Polar head size and the presence of a free hydroxyl group in position sn2 of the glycerol backbone, properties that should modify the degree of solvation at the surface of interfaces [7], should play a key role in the mechanisms that modulate lipid-dependent amyloid fibril formation [7,9]. In this case, the hydrophilic components of phospholipids such as a free hydroxyl group in LPA, may affect

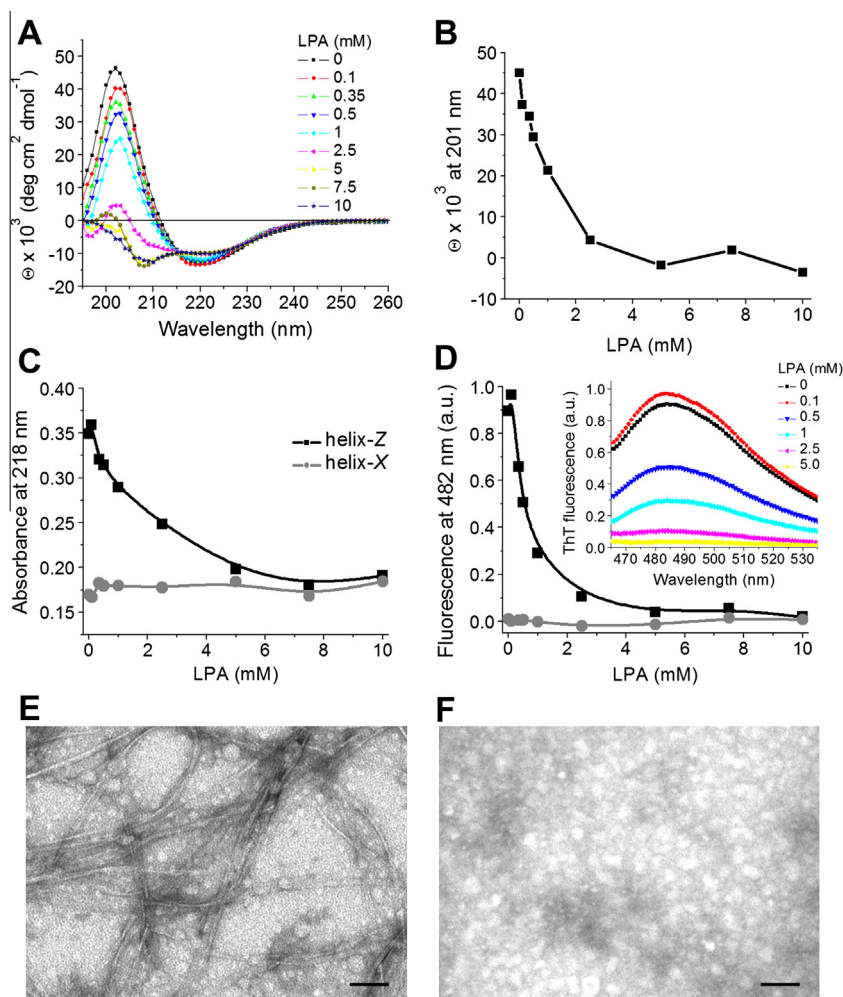


Fig. 3. Lysophosphatidic acid prevents the formation of amyloid fibrils by helix-Z. (A) CD spectra of helix-Z incubated with increasing concentrations of LPA. (B) Mean molar ellipticity values at 201 nm. (C) Absorbance values at 218 nm. (D) ThT-fluorescence at 482 nm. The native peptide was used as control. The insert shows the emission spectra of helix-Z at different days. (E) Amyloid fibrils formed by helix-Z. (F) Effect of LPA treatment in the formation of fibrils. Four samples were processed on different days. Bars correspond to 100 nm.

the position and the array of the hydrophobic assemblies in relation to the interface [17]. We tested this possibility by treatment with increasing concentrations of PA, a lipid molecule with two acyl chains associated to the glycerol backbone, conditions that should not favor the conformational change from β -sheet structures to an α -helix. Employing spectroscopic techniques, this thesis was corroborated using a concentration range of 0.1–5 mM PA, when a β -sheet structure was maintained and the property to form amyloid fibrils was observed when peptide helix-Z was studied (Supplementary Fig. 2).

Considering that the electrostatic charge on lipid surfaces is a factor that could modulate the secondary structure of helix-Z, we studied the effect of a series of phospholipids mixed with LPA (76%/24%) (Fig. 4). Peptide treatment with micelles formed with POPC/POPG and LPA does not modify the profile of the β -secondary structure evaluated by CD and ThT fluorescence (Fig. 4A and B). This condition is maintained throughout the concentration range of 0.1–2.4 mM of these mixtures, showing micelle formation at the highest concentrations (data not shown).

When helix-Z was incubated with neutral vesicles composed of POPC (1.23 mM) and LPA (0.37 mM), CD spectra and fluorescence emission values were similar to the control values without the addition of lipids (Fig. 4A and B). A similar response was obtained when neutral micelles formed by phosphatidylcholine (PC) were studied, a condition in which the formation of well-defined amyloid fibrils is maintained (Fig. 4C and D). Since an extended incubation time (24 h) was used, the presence of oligomeric structures was reduced [5]. However, in these samples it was possible to identify amyloid fibrils located at the surface of lipid micelles (Fig. 4D insert), a condition that suggests there might be interactions at the surface of micelles without the presence of a structural change in helix-Z.

Treatment with increasing concentrations of lipids contained in mixtures composed of PC/cholesteryl-esters extensively used in a previous work employing CETP [18], did not modulate the structural changes described above for LPA and lyso- C_{12} PC and only a slight decrease in β -structure content was recorded (data not shown).

Under the same conditions, incubation with neutral micelles formed by DPPC and LPA maintains a β -sheet conformation in helix-Z. Nevertheless, in this case an increase in the fluorescence spectrum of ThT was registered, condition that is related to the presence of high concentrations of fibrils shown by samples processed for NS-TEM. Several characteristics related to the morphology of these fibrils showing a highly heterogeneous pattern, were registered (Fig. 4E).

Treatment with micelles composed of phosphatidylethanolamine (PE) and LPA presenting a positive charge at their surface and a small polar head group, induced a moderate decrease in the content of β -structures of helix-Z (Fig. 4A and B). Likewise, lower amounts of amyloid fibrils were recorded with respect to previous lipid treatments (Fig. 4F). Under our experimental conditions, at neutral pH helix-Z maintains a net negative charge (-1), in such a way that these results could be associated with a low electrostatic binding capacity at the surface of positive charged vesicles. Interestingly, when helix-X, the native C-terminus domain of CETP in a disordered state was evaluated in the presence of PE/LPA vesicles, the highest levels of α -helix are promoted (Supplementary Fig. 3).

A hydrophobic cluster at the C-terminus domain of CETP 467 LLVNFLQ 473 originated by mutation D $_{470}$ N shares similar characteristics with the hydrophobic structural motifs for *steric zippers*, which have been described to integrate the molecular structure of amyloid fibrils [19,20]. In this sense, mutation D $_{470}$ N minimizes the electrostatic repulsion between peptide monomers, promoting the formation of hydrogen bonds in the backbone and triggering β -sheet and fibril formation in helix-Z [5]. These phenomena are restricted to the C-terminus end (residues 465–476), since peptide sequences that corresponds to 460 DFGFPEHL 467 , do not show β -sheet formation, and even in the presence of lipids the peptide remains in a disordered state (data not shown).

The inhibition of fibril formation and stabilization of an α -helical structure in helix-Z seem to be directly associated with the specific physicochemical properties of LPA. The presence of a free hydroxyl group and a small polar head group may facilitate the molecular recognition for helix-Z, allowing the interaction of

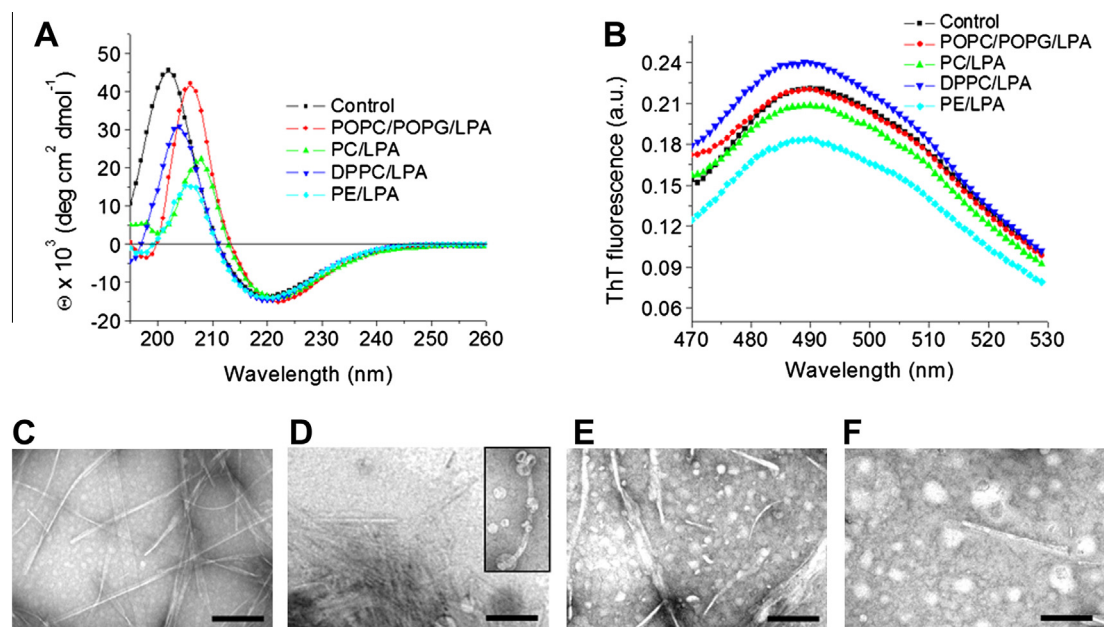


Fig. 4. Effect of lipid electrostatic charge upon the structure of helix-Z. (A) CD spectra of helix-Z incubated with lipid micelles of different composition. (B) Emission spectra of ThT-fluorescence. NS-TEM of helix-Z without lipid treatment (C), and with micelles composed of PC/LPA (D), DPPC/LPA (E) and PE/LPA (F). Bars correspond to 200 nm.

monomeric peptides at the surface of micelles. Therefore, nucleation and stacking of peptides, phenomena that lead to aggregation and ultimately to fibril formation are suppressed. In this sense, it has been reported that the stability of native folding is primarily determined by hydrophobic interactions between side chains, whereas the stability of amyloid fibrils is more dependent on backbone intermolecular hydrogen bonding interactions [21].

On the other hand, a large group of events occurring at the surface of lipids are influenced by hydrogen bonding networks [22], in such a way that binding of lipid/helix-Z at the surface of micelles or lipoproteins may involve the release of highly ordered water molecules located at the first layers of hydration, with the consequent reorganization of hydrogen bonds and hydrophobic interactions. Hence, conformational changes and modulation of secondary structure of peptides requires key conditions associated to the microenvironment, being key components the degree of solvation and the size of the polar head of lipids. In conclusion, our results suggest a regulatory role for LPA by modulating the mechanisms that maintain the C-terminus domain of CETP in a functional conformation directly associated to the presence of an α -helical structure for this segment.

Acknowledgments

We would like to thank Blanca Delgado for technical assistance and Rodolfo Paredes for technical support with NS-TEM samples. The authors also thank José Luis Perez-García and Nadia Gutierrez for text editing. This study was partially supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (Grant 083673) and DGAPA/UNAM (Grant IN205711), both awarded to J.M.-O. V.G.-G. receives a scholarship from CONACyT.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.03.067>.

References

- [1] A.L. Alonso, A. Zentella-Dehesa, J. Mas-Oliva, Characterization of a naturally occurring new version of the cholesterol ester transfer protein (CETP) from small intestine, *Mol. Cell. Biochem.* 245 (2003) 173–182.
- [2] S. Wang, P. Kussie, L. Deng, A. Tall, Defective binding of neutral lipids by a carboxyl-terminal deletion mutant of cholesteryl ester transfer protein. Evidence for a carboxyl-terminal cholesteryl ester binding site essential for neutral lipid transfer activity, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 612–618.
- [3] S. Wang, X. Wang, L. Deng, E. Rassart, R.W. Milne, A.R. Tall, Point mutagenesis of carboxyl-terminal amino acids of cholesteryl ester transfer protein. Opposite faces of an amphipathic helix important for cholesteryl ester transfer or for binding neutralizing antibody, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 1955–1959.
- [4] V.M. Bolaños-García, M. Soriano-García, J. Mas-Oliva, Stability of the C-terminal peptide of CETP mediated through an (i, i + 4) array, *Biochim. Biophys. Acta* 1384 (1998) 7–15.
- [5] V. García-González, J. Mas-Oliva, Amyloidogenic properties of a D/N mutated 12 amino acid fragment of the C-terminal domain of the cholesteryl-ester transfer protein (CETP), *Int. J. Mol. Sci.* 12 (2011) 2019–2035.
- [6] A. Andreola, V. Bellotti, S. Giorgetti, P. Mangione, L. Obici, M. Stoppini, J. Torres, E. Monzani, G. Merlini, M. Sunde, Conformational switching and fibrillogenesis in the amyloidogenic fragment of apolipoprotein A-I, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 2444–2451.
- [7] P. Mendoza-Espinosa, A. Moreno, R. Castillo, J. Mas-Oliva, Lipid dependant disorder-to-order conformational transitions in apolipoprotein CI derived peptides, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 365 (2008) 8–15.
- [8] A.M. Sheikh, A. Nagai, Lysophosphatidylcholine modulates fibril formation of amyloid beta peptide, *FEBS J.* 278 (2011) 634–642.
- [9] P. Mendoza-Espinosa, V. García-González, A. Moreno, R. Castillo, J. Mas-Oliva, Disorder-to-order conformational transitions in protein structure and its relationship to disease, *Mol. Cell. Biochem.* 330 (2009) 105–112.
- [10] E. Evangelisti, C. Cecchi, R. Cascella, C. Sgromo, M. Becatti, C.M. Dobson, F. Chiti, M. Stefani, Membrane lipid composition and its physicochemical properties define cell vulnerability to aberrant protein oligomers, *J. Cell Sci.* 125 (2012) 2416–2427.
- [11] V.G. García-González, J. Mas-Oliva, *El Concepto de Enfermedad Asociado a la Conformación de Proteínas*, first ed., Universidad Nacional Autónoma de México and El Manual Moderno, Mexico, 2012.
- [12] T. Ookoshi, K. Hasegawa, Y. Ohhashi, H. Kimura, N. Takahashi, H. Yoshida, R. Miyazaki, Y. Goto, H. Naiki, Lysophospholipids induce the nucleation and extension of beta2-microglobulin-related amyloid fibrils at a neutral pH, *Nephrol. Dial. Transplant.* 23 (2008) 3247–3255.
- [13] H. Pál-Gábor, L. Gombos, A. Micsónai, E. Kovács, E. Petrik, J. Kovács, L. Gráf, J. Fidy, H. Naiki, Y. Goto, K. Liliom, J. Kardos, Mechanism of lysophosphatidic acid-induced amyloid fibril formation of beta(2)-microglobulin in vitro under physiological conditions, *Biochemistry* 48 (2009) 5689–5699.
- [14] K. Nakanaga, K. Hama, J. Aoki, Autotaxin an LPA producing enzyme with diverse functions, *J. Biochem.* 148 (2010) 13–24.
- [15] S. Okudaira, H. Yukiura, J. Aoki, Biological roles of lysophosphatidic acid signaling through its production by autotaxin, *Biochimie* 92 (2010) 698–706.
- [16] S. Yamamoto, K. Hasegawa, I. Yamaguchi, S. Tsutsumi, J. Kardos, Y. Goto, F. Gejyo, H. Naiki, Low concentrations of sodium dodecyl sulfate induce the extension of beta 2-microglobulin-related amyloid fibrils at a neutral pH, *Biochemistry* 43 (2004) 11075–11082.
- [17] D. Chandler, Interfaces and the driving force of hydrophobic assembly, *Nature* 437 (2005) 640–647.
- [18] V. García-González, N. Gutiérrez-Quintanar, P. Mendoza-Espinosa, P. Brocos, Á. Piñero, R. Castillo, J. Mas-Oliva, Key structural arrangements at the C-terminus domain of CETP promote a mechanism for lipid-transfer activity, unpublished results.
- [19] M.R. Sawaya, S. Sambashivan, R. Nelson, M.I. Ivanova, S.A. Sievers, M.I. Apostol, M.J. Thompson, M. Balbirnie, J.J. Wiltzius, H.T. McFarlane, A.Ø. Madsen, C. Riekel, D. Eisenberg, Atomic structures of amyloid cross-beta spines reveal varied steric zippers, *Nature* 447 (2007) 453–457.
- [20] S.A. Sievers, J. Karanicolas, H.W. Chang, A. Zhao, L. Jiang, O. Zirafi, J.T. Stevens, J. Münch, D. Baker, D. Eisenberg, Structure-based design of non-natural amino-acid inhibitors of amyloid fibril formation, *Nature* 475 (2011) 96–100.
- [21] A.W. Fitzpatrick, T.P. Knowles, C.A. Waudby, M. Vendruscolo, C.M. Dobson, Inversion of the balance between hydrophobic and hydrogen bonding interactions in protein folding and aggregation, *PLoS Comput. Biol.* 7 (2011) e1002169.
- [22] M.Ø. Jensen, O.G. Mouritsen, G.H. Peters, The hydrophobic effect: molecular dynamics simulations of water confined between extended hydrophobic and hydrophilic surfaces, *J. Chem. Phys.* 120 (2004) 9729–9744.

VII. Capítulo en libro conmemorativo de la ANM: “Nuevos Péptidos y Proteínas con la Capacidad de Unión a Lipopolisacáridos como Potenciales Agentes Terapéuticos contra el Choque Séptico”

VII. Capítulo en libro conmemorativo de la ANM: “Nuevos Péptidos y Proteínas con la Capacidad de Unión a Lipopolisacáridos como Potenciales Agentes Terapéuticos contra el Choque Séptico”

En la parte final del doctorado se tuvo participación en el capítulo “Nuevos Péptidos y Proteínas con la Capacidad de Unión a Lipopolisacáridos como Potenciales Agentes Terapéuticos contra el Choque Séptico” que aparecerá en el libro conmemorativo de los 150 años de la fundación de la Academia Nacional de Medicina de México. Únicamente se presenta el resumen del trabajo.

Resumen

El sistema inmune innato al proveer un rápido y efectivo sistema de defensa altamente regulado contra infecciones microbianas, bajo ciertas condiciones puede llevar a cabo una respuesta exacerbada, la cual a su vez puede representar un riesgo para la homeostasis del organismo. Se ha descrito que a través de una serie de eventos responsables de la transición de sepsis a choque séptico, tanto la activación celular de monocitos, macrófagos y neutrófilos, así como la aparición de una gran cantidad de moléculas provenientes de las células bacterianas en circulación, son importantes en esta transición. Particularmente, uno de los factores primarios que desencadenan las condiciones adversas en el choque séptico son los LPS, lípidos que forman parte de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. En este sentido, la literatura especializada muestra a un grupo de proteínas y péptidos con características catiónicas que presentan afinidad por la superficie microbiana cargada negativamente y por lo tanto por los LPS, que a su vez se han utilizado como moléculas amortiguadoras o bloqueadoras de la acción tóxica de estos lípidos sobre la membrana plasmática de diversos tipos celulares del torrente circulatorio al igual que de la pared vascular.

En nuestro laboratorio, desde hace ya algunos años, se descubrió la isoforma CETPI, la cual no presenta la capacidad de transferir lípidos entre lipoproteínas. Estudios experimentales recientes sugieren que esta proteína en busca de función puede

estar relacionada con la unión a los LPS. A través del diseño y uso de péptidos derivados de un nuevo dominio clave situado en el extremo C-terminal de CETPI, hemos documentado la presencia de una función bloqueadora del efecto citotóxico inducido por los LPS. Independientemente de los estudios que han realizado grupos de trabajo internacionales con diversos péptidos y proteínas en el bloqueo de los LPS, estos tratamientos no han sido completamente efectivos. Con el descubrimiento de esta nueva potencial función fisiológica para CETPI, se abre una nueva posibilidad para ampliar nuestros estudios básicos, al diseño específico de péptidos derivados de su dominio C-terminal y la extensión a la experimentación *in vivo*.

El presente capítulo revisa el estado del arte en el uso de proteínas y péptidos que presentan la capacidad de interactuar con los LPS y su potencial uso en el control del choque séptico.

VIII. Publicación: Lipopolysaccharide-binding function determined by the C-terminus domain of CETPI. García-González V, Gutiérrez-Quintanar N, Mas-Oliva J (2014). En revisión.

En este apartado se presentan solamente las páginas iniciales del manuscrito.

1 **The C-terminus Domain of CETPI Defines its Function as a New Plasma**
2 **Lipopolysaccharide-Binding Protein.**

3

4 Victor García-González, Nadia Gutiérrez-Quintanar & Jaime Mas-Oliva*

5 Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. 04510

6 México, D.F. México.

7 *Correspondence should be addressed to J.M-O (jmas@ifc.unam.mx).

8

9

10

11 **Abstract**

12

13 The isoform cholesteryl-ester transfer protein (CETPI) expressed only in the small
14 intestine and present in plasma was described by our group previously, but there was no
15 evidence about its function and its plausible physiological importance. The canonical
16 protein CETP, promotes the transfer of neutral lipids between lipoproteins and the critical
17 site for its function is situated at the C-terminus domain structured as an amphiphatic α -
18 helix. Notwithstanding, CETPI does not have the key α -helix structure at the C-terminus
19 domain, and instead a new sequence with a high content in prolines and positively charged
20 residues are contained, characteristics that promote a disordered secondary structure, which
21 is not modulated by lipid environment. Considering that CETPI expression in small
22 intestine cell cultures responds to a lipopolysaccharide (LPS) stimuli, we hypothesized that
23 CETPI potential function is associated with binding to LPS. Through the use of peptides
24 derived from the C-terminus domain we characterized the LPS binding properties, function
25 that is determined by surface electrostatic interactions, covering a range of several LPS
26 serotypes. Furthermore, peptide interactions at the lipid A site promote a rearrangement on
27 LPS conformation. Specifically, the treatment with a peptide derived from the last 18

1 residues, named VSAK, protects against cytotoxic effects induced by LPS on macrophages,
2 by means of the blocking of LPS interaction on the cell surface, condition that reduces the
3 expression of pro-inflammatory cytokines and the oxidative stress phenomenon. Indeed, in
4 a rabbit septic shock model, the administration of peptide VSAK demonstrated to have a
5 protective role of LPS effects in circulation. Taking into account the natural CETPI
6 expression, the use of C-terminus domain could represent an optimal therapeutic strategy
7 for septic shock treatment.

8 **Author Summary**

9 Non-technical summary
10 In the first person voice
11 Present the significance or possible implications of your work simply and objectively
12 The goal is make your finding accessible to a wide audience
13

14 **Introduction**

15
16 CETPI has been demonstrated to be only expressed in the small intestine and it is
17 present in plasma under basal conditions [1]. Unlike CETP, CETPI does not present exon
18 16 and 54 bases contained in intron 15 form part of the new mRNA replacing the 24 C-
19 terminus residues present in CETP with a sequence of 18 residues with a high content of
20 prolines and positively charged amino acids [1].

21 Based on phylogenetic studies, a family of proteins denominated PLUNC (palate, lung,
22 and nasal epithelium clone) has been described, including proteins associated to
23 immunomodulation, as well as lipid transport and LPS binding. Members of this family
24 include proteins such as CETP, BPI (bactericidal/permeability-increasing protein) and LBP
25 (lipopolysaccharide binding protein) [2].

1 Although BPI and LBP share the most important structural elements and show high
2 tridimensional structure similarities with CETP, they only present respectively a 19 and a
3 21 % homology in primary structure. In this respect, it is interesting to point out that in
4 terms of primary structure, CETP and CETPI show an exact amino acid sequence with the
5 only exception of 18 residues at their C-terminus region and therefore showing a 98 %
6 homology [1]. Given the presence of LBP and BPI in human plasma associated to a LPS
7 binding activity, the present study exploring the C-terminus domain of CETPI, investigates
8 the potential ability of the newly described protein to bind LPS, as well as its potential
9 interaction with the cell membrane of bacteria and modulation of LPS-induced cellular
10 oxidative stress.

11 An essential component of the outer membrane in Gram-negative bacteria are LPS,
12 phosphorylated glycolipids unique to each bacterial species. In general, LPS consist of four
13 components: lipid A, the inner core, the outer core and the O-antigen. However, most of the
14 variations found between LPS reside on lipid A, the hydrophobic lipid moiety that anchors
15 LPS to the outer leaflet membrane of bacteria. Lipid A is also considered an important
16 element, since it represents the toxic moiety of these molecules [3]. In the bloodstream,
17 when lipid A is exposed, the immune response is activated and a series of cytokine
18 mediators of inflammation released into circulation. In this regard, LPS-mediated
19 dysregulation of the innate immune response following an infection, could result in an
20 exacerbated systemic inflammation, leading to hemodynamic pathogenesis and metabolic
21 derangement that could trigger the development of septic shock [4,5].

22 During an infection event and therefore the establishment of an inflammatory condition,
23 it has been reported that the main function of CETP in the reverse cholesterol transport
24 system mobilizing cholesteryl-esters from high density lipoproteins (HDL) to very low

1 density lipoproteins (VLDL) rich in triglycerides, is decreased. This phenomenon also
2 conditions a lower synthesis of hepatic CETP mRNA [6,7]. Moreover, it has been shown
3 that low serum HDL concentrations might be considered a risk factor in the initiation of
4 septic shock, an even associated to an increased mortality [8]. Since a high HDL serum
5 concentration and their capacity to bind LPS has been taken as a protective factor against
6 sepsis [8], the LPS inhibitory action upon CETP in plasma might have the consequence to
7 displace the equilibrium towards an adequate formation of HDL particles. The optimal
8 formation of HDL particles would neutralize LPS and effectively direct these particles to
9 the liver. Taking into consideration this mechanism together with the LPS binding activity
10 of LBP and BPI, our study places CETPI as a new molecule involved in the neutralization
11 of deleterious effects of LPS in circulation.

12 Through experimentation with chemically synthesized peptides derived from the C-
13 terminus domain of CETPI, we demonstrate that LPS binding properties of the protein
14 reside on this region. Moreover, based on these results and the tridimensional structure
15 similarities between CETPI and other LPS binding proteins, we demonstrate that the new
16 protein discovered in our laboratory shows improved physicochemical characteristics
17 associated to LPS binding in comparison to the rest of members of the PLUNC family.
18 CETPI is overexpressed in small intestine cell cultures in the presence of LPS and based
19 upon *in vivo* experimentation employing experimental animals with septic shock, the
20 efficacy of the administration of peptide VSAK derived from the C-terminus domain of
21 CETPI demonstrated to block LPS actions in circulation.

22

IX. Solicitud de patente: Péptidos derivados del dominio C-terminal de CETPI como moléculas bloqueadoras del efecto citotóxico inducido por lipopolisacáridos en septicemia y choque séptico

IX. Solicitud de patente: Péptidos derivados del dominio C-terminal de CETPI como moléculas bloqueadoras del efecto citotóxico inducido por lipopolisacáridos en septicemia y choque séptico

De manera paralela al trabajo académico realizado durante los estudios del doctorado, se realizó la redacción de la patente: “Uso de péptidos derivados del dominio C-terminal de CETPI como moléculas bloqueadoras del efecto citotóxico inducido por lipopolisacáridos”. Cabe señalar que la parte fundamental de esta invención se deriva del trabajo académico, y como estrategia se eligió someter la patente ante el IMPI, para posteriormente realizar el envío para la revisión y publicación del artículo “Lipopolysaccharide-binding function determined to the C-terminus domain of CETPI”.

La presente invención se relaciona con el diseño y uso de péptidos derivados del dominio C-terminal de CETPI como moléculas bloqueadoras del efecto citotóxico inducido por lipopolisacáridos, para formular un medicamento para el tratamiento de la septicemia y choque séptico causado por bacterias Gram-negativas.

La presente invención divulga un péptido usado como molécula para el tratamiento del choque séptico, así como un sistema para la identificación y cuantificación de la proteína CETPI basado en la técnica de ELISA. El péptido SEQ ID NO: 3 (últimos 18 residuos) ha mostrado condiciones de protección contra efectos citotóxicos asociados con el choque séptico en el modelo celular de macrófagos, sin presentar toxicidad por su tratamiento en varios modelos experimentales. La protección del péptido SEQ ID NO: 3 está relacionada con la unión específica a lípidos del tipo de los LPS. El péptido SEQ ID NO: 3 puede interactuar con varios serotipos de LPS, como se indica en varias figuras del documento, y por medio de la unión podría impedir la interacción de los LPS a sus receptores blanco que desencadenan la respuesta inflamatoria. De manera que el péptido SEQ ID NO: 3 puede mantener en una forma inactiva a los LPS.

A través de la experimentación en conejos se ha evidenciado un papel protector de la SEQ ID NO: 3. Si bien muchos trabajos se han enfocado en el uso de péptidos para neutralizar los efectos de los LPS, es frecuente encontrar que en las investigaciones realizadas por otros grupos se requieren de altos índices de molaridad LPS/péptido, ocasionando que su uso sea restringido debido a la citotoxicidad intrínseca generada por los péptidos en concentraciones altas. En nuestro protocolo experimental, los mejores resultados fueron obtenidos con una relación 1-200 (LPS-SEQ ID NO: 3), equivalente a una dosis única de SEQ ID NO: 3 (60 µg/kg). Esta dosis representa una condición intermedia, y de forma importante la administración de la SEQ ID NO: 3 no originó ningún efecto adverso. Actualmente, el texto se encuentra en trámite en la UNAM para su ingreso al IMPI.

PCT

PETITORIO

El abajo firmante pide que la presente solicitud internacional sea tramitada con arreglo al Tratado de Cooperación en materia de Patentes.

Para uso de la Oficina receptora únicamente	
PCT/MX 2014 / 000087	
Solicitud internacional N°	
(11.06.2014) 11 JUN 2014	
Fecha de presentación internacional	
SOLICITUD INTERNACIONAL PCT/RO/101	
Número de la Oficina receptora y Solicitud Internacional PCT	
Referencia al expediente del solicitante o del mandatario (si se desea) (como máximo, 12 caracteres)	

Recuadro N° I TÍTULO DE LA INVENCIÓN	
PÉPTIDOS DERIVADOS DEL DOMINIO C-TERMINAL DE CETPI COMO MOLÉCULAS BLOQUEADORAS DEL EFECTO CITOTÓXICO INDUCIDO POR LIPOPOLISACÁRIDOS EN SEPTICEMIA Y CHOQUE SÉPTICO	
Recuadro N° II SOLICITANTE <input type="checkbox"/> Esta persona también es inventor.	
Nombre y dirección: (apellido seguido del nombre; si se trata de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección deben figurar el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este recuadro es el Estado de domicilio del solicitante si no se indica más abajo el Estado de domicilio.) UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO 9° Piso de la Torre de Rectoría Ciudad Universitaria S/N, C.P. 04510 Distrito Federal MX	N° de teléfono (52+55) 56 22 63 29 N° de facsímil (52+55) 56 65 46 44 N° de registro del solicitante en la Oficina
Autorización a utilizar el correo-e. Al marcar una de las casillas que figuran abajo se autoriza a la Oficina receptora, la Administración de búsqueda internacional, la Oficina Internacional y la Administración de examen preliminar internacional a utilizar la dirección de correo-e que se indica en este recuadro para enviar notificaciones relativas a la presente solicitud internacional, si dichas oficinas así lo desean <input type="checkbox"/> como copias previas por vía electrónica seguidas de las notificaciones en papel o, <input type="checkbox"/> por correo electrónico exclusivamente (no se enviará ninguna notificación en papel) Dirección de correo-e:	
Estado de nacionalidad (nombre del Estado): MX	Estado de domicilio (nombre del Estado): MX
Esta persona es solicitante para: <input checked="" type="checkbox"/> todos los Estados designados <input type="checkbox"/> los Estados indicados en el recuadro suplementario	
Recuadro N° III OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)	
<input checked="" type="checkbox"/> Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja de continuación.	
Recuadro N° IV MANDATARIO O REPRESENTANTE COMÚN; O DIRECCIÓN PARA LA CORRESPONDENCIA	
La persona abajo identificada se nombra/ha sido nombrada para actuar en nombre del/ de los solicitante(s) ante las administraciones internacionales competentes como: <input checked="" type="checkbox"/> mandatario <input type="checkbox"/> representante común	
Nombre y dirección: (apellido seguido del nombre; si se trata de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección deben figurar el código postal y el nombre del país.) FIGUEROA PÉREZ, Martha Edificio B, 3er Piso, Zona Cultural Ciudad Universitaria, C.P. 04510 Distrito Federal MX	N° de teléfono (52+55) 56 22 63 29 N° de facsímil (52+55) 56 65 46 44 N° de registro del mandatario en la Oficina RGP-DDAJ-14782
Autorización a utilizar el correo-e. Al marcar una de las casillas que figuran abajo se autoriza a la Oficina receptora, la Administración de búsqueda internacional, la Oficina Internacional y la Administración de examen preliminar internacional a utilizar la dirección de correo-e que se indica en este recuadro para enviar notificaciones relativas a la presente solicitud internacional, si dichas oficinas así lo desean <input checked="" type="checkbox"/> como copias previas por vía electrónica seguidas de las notificaciones en papel o, <input type="checkbox"/> por correo electrónico exclusivamente (no se enviará ninguna notificación en papel) Dirección de correo-e: marthafp@unam.mx	
<input type="checkbox"/> Dirección para la correspondencia: márchese esta casilla cuando no se nombre/se haya nombrado ningún mandatario o representante común y el espacio de arriba se utilice en su lugar para indicar una dirección especial a la que deba enviarse la correspondencia.	

Recuadro N° III OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)	
Si no se ha de utilizar ninguno de estos subrecuadros, esta hoja no debe ser incluida en el petitorio.	
<p>Nombre y dirección: (apellido seguido del nombre; si se trata de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección deben figurar el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este recuadro es el Estado de domicilio del solicitante si no se indica más abajo el Estado de domicilio.)</p> <p>MAS OLIVA, Jaime Instituto de Fisiología Celular, Laboratorio 322 Norte Circuito Exterior S/N, Ciudad Universitaria, C.P. 04510 Distrito Federal MX</p>	<p>Esta persona es:</p> <p><input type="checkbox"/> solicitante únicamente</p> <p><input type="checkbox"/> solicitante e inventor</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> inventor únicamente (si se marca esta casilla, no se debe rellenar lo que sigue.)</p> <p>N° de registro del solicitante en la Oficina</p>
Estado de nacionalidad (nombre del Estado):	Estado de domicilio (nombre del Estado):
Esta persona es solicitante para: <input type="checkbox"/> todos los Estados designados <input type="checkbox"/> los Estados indicados en el recuadro suplementario	
<p>Nombre y dirección: (apellido seguido del nombre; si se trata de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección deben figurar el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este recuadro es el Estado (es decir, país) de domicilio del solicitante si no se indica más abajo el Estado de domicilio.)</p> <p>GUTIERREZ QUINTANAR, Nadia Instituto de Fisiología Celular, Laboratorio 322 Norte Circuito Exterior S/N, Ciudad Universitaria, C.P. 04510 Distrito Federal MX</p>	<p>Esta persona es:</p> <p><input type="checkbox"/> solicitante únicamente</p> <p><input type="checkbox"/> solicitante e inventor</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> inventor únicamente (si se marca esta casilla, no se debe rellenar lo que sigue.)</p> <p>N° de registro del solicitante en la Oficina</p>
Estado de nacionalidad (nombre del Estado):	Estado de domicilio (nombre del Estado):
Esta persona es solicitante para: <input type="checkbox"/> todos los Estados designados <input type="checkbox"/> los Estados indicados en el recuadro suplementario	
<p>Nombre y dirección: (apellido seguido del nombre; si se trata de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección deben figurar el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este recuadro es el Estado de domicilio del solicitante si no se indica más abajo el Estado de domicilio.)</p> <p>GARCIA GONZALEZ, Víctor Guadalupe Instituto de Fisiología Celular, Laboratorio 322 Norte Circuito Exterior S/N, Ciudad Universitaria, C.P. 04510 Distrito Federal MX</p>	<p>Esta persona es:</p> <p><input type="checkbox"/> solicitante únicamente</p> <p><input type="checkbox"/> solicitante e inventor</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> inventor únicamente (si se marca esta casilla, no se debe rellenar lo que sigue.)</p> <p>N° de registro del solicitante en la Oficina</p>
Estado de nacionalidad (nombre del Estado):	Estado de domicilio (nombre del Estado):
Esta persona es solicitante para: <input type="checkbox"/> todos los Estados designados <input type="checkbox"/> los Estados indicados en el recuadro suplementario	
<p>Nombre y dirección: (apellido seguido del nombre; si se trata de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección deben figurar el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este recuadro es el Estado de domicilio del solicitante si no se indica más abajo el Estado de domicilio.)</p>	<p>Esta persona es:</p> <p><input type="checkbox"/> solicitante únicamente</p> <p><input type="checkbox"/> solicitante e inventor</p> <p><input type="checkbox"/> inventor únicamente (si se marca esta casilla, no se debe rellenar lo que sigue.)</p> <p>N° de registro del solicitante en la Oficina</p>
Estado de nacionalidad (nombre del Estado):	Estado de domicilio (nombre del Estado):
Esta persona es solicitante para: <input type="checkbox"/> todos los Estados designados <input type="checkbox"/> los Estados indicados en el recuadro suplementario	
<input type="checkbox"/> Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en otra hoja de continuación.	

Recuadro N° V DESIGNACIONES

Según la Regla 4.9.a), la presentación de este petitorio **constituye la designación** de todos los Estados contratantes vinculados por el PCT en la fecha de presentación internacional a efectos de todo tipo de protección disponible y, cuando proceda, de la concesión tanto de patentes regionales como de patentes nacionales.

Sin embargo,

- DE Alemania **no se designa** para ningún tipo de protección nacional
- JP Japón **no se designa** para ningún tipo de protección nacional
- KR República de Corea **no se designa** para ningún tipo de protección nacional

(Se puede utilizar las casillas de arriba para excluir (de manera irrevocable) las designaciones en cuestión, a condición de que la solicitud internacional, en la fecha de presentación o posteriormente según la Regla 26bis.1, reivindique en el Recuadro N° VI la prioridad de una solicitud nacional anterior presentada en el Estado en cuestión, para evitar que, en virtud de la ley nacional, cesen los efectos de esta solicitud anterior).

Recuadro N° VI REIVINDICACIÓN DE PRIORIDAD Y DOCUMENTO DE PRIORIDAD

Se reivindica la prioridad de las siguientes solicitudes anteriores:

Fecha de presentación de la solicitud anterior (día/mes/año)	Número de la solicitud anterior	Si la solicitud anterior es:		
		solicitud nacional: país o miembro de la OMC	solicitud regional: Oficina regional	solicitud internacional: Oficina receptora
Punto (1)				
Punto (2)				
Punto (3)				

En el recuadro suplementario se incluyen reivindicaciones de prioridad adicionales

Presentación del (de los) documento(s) de prioridad:

Se pide a la **Oficina receptora** que prepare y transmita a la Oficina Internacional una copia certificada de la o las solicitudes anteriores *(únicamente si esta o estas solicitudes anteriores han sido presentadas en la Oficina que, a los fines de esta solicitud internacional, es la Oficina receptora)* indicadas arriba como:

- todos los puntos Punto (1) Punto (2) Punto (3) otros, ver recuadro suplementario

Se pide a la **Oficina Internacional** que obtenga en una biblioteca digital una copia certificada de la o las solicitudes anteriores indicadas arriba, usando el código o los códigos de acceso, si los hay, indicados a continuación *(si la Oficina Internacional tiene acceso a esta o estas solicitudes anteriores en una biblioteca digital)*:

- Punto (1) código de acceso _____ Punto (2) código de acceso _____ Punto (3) código de acceso _____ otros, ver recuadro suplementario

Restaurar el derecho de prioridad: se solicita a la Oficina receptora que restaure el derecho de prioridad respecto a la(s) solicitud(es) anterior(es) indicada(s) más arriba o en el recuadro suplementario como punto(s): (_____). *(Véanse también las Notas del Recuadro N° VI; se darán informaciones más amplias que apoyen la petición de restauración del derecho de prioridad).*

Incorporación por referencia: cuando un elemento de la solicitud internacional mencionado en el Artículo 11.1)iii)d) o e) o una parte de la descripción, de las reivindicaciones o de los dibujos mencionada en la Regla 20.5.a) no está contenido en otro lugar en esta solicitud internacional pero figura íntegramente en una solicitud anterior cuya prioridad se reivindica en la fecha en la que uno o varios elementos mencionados en el Artículo 11.1)iii) fueron recibidos inicialmente por la Oficina receptora, ese elemento o esa parte, a reserva de confirmación según la Regla 20.6, se incorporará por referencia en esta solicitud internacional a los efectos de la Regla 20.6.

Recuadro N° VII ADMINISTRACIÓN ENCARGADA DE LA BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Elección de la Administración encargada de la búsqueda internacional *(si más de una Administración encargada de la búsqueda internacional es competente para efectuar la búsqueda internacional, indíquese el nombre de la Administración elegida; se puede utilizar el código de dos letras):*

ISA / ES

Recuadro N° IX LISTA DE VERIFICACIÓN para las presentaciones en PAPEL - esta hoja se emplea exclusivamente para las solicitudes internacionales presentadas en PAPEL

La presente solicitud internacional contiene lo siguiente:	Número de hojas	La presente solicitud internacional va acompañada del(los) siguiente(s) documento(s) (marcar las casillas que procedan e indicar en la columna de la derecha el número de cada documento):	Número de documentos
a) petitorio (PCT/RO/101) (incluidas las hojas de declaración y suplementarias)	4	1. <input type="checkbox"/> hoja de cálculo de tasas	
b) descripción (exceptuando la parte de la descripción reservada a la lista de secuencias (véase el punto f) infra)	22	2. <input type="checkbox"/> poder separado original	
c) reivindicaciones	3	3. <input type="checkbox"/> poder general original	
d) resumen	1	4. <input type="checkbox"/> copia del poder general; número de referencia:	
e) dibujos (en su caso)	16	5. <input type="checkbox"/> documento(s) de prioridad identificado(s) en el Recuadro N° VI como punto o puntos	
f) parte de la descripción reservada a la lista de secuencias (en su caso)	2	6. <input type="checkbox"/> traducción de la solicitud internacional (idioma) :	
Número total de hojas:	48	7. <input type="checkbox"/> indicaciones separadas relativas a microorganismos depositados o a otro material biológico	
		8. <input type="checkbox"/> copia en formato electrónico (Anexo C/ST. 25, formato texto,) con soportes lógicos de la lista de secuencias que no forma parte de la solicitud internacional, entregada únicamente a los fines de la búsqueda internacional en virtud de la Regla 13ter (indicar el tipo y el número de soportes lógicos)	
		9. <input type="checkbox"/> una declaración confirmando que "la información registrada en formato electrónico en virtud de la Regla 13ter es idéntica a la lista de secuencias tal como se presentó en papel en la solicitud internacional"	
		10. <input type="checkbox"/> copia de los resultados de búsquedas anteriores (Regla 12bis.1.a)	
		11. <input type="checkbox"/> otros (especifíquese):	
Figura de los dibujos que debe acompañar el resumen:	9 A	Idioma de presentación de la solicitud internacional:	Español

Recuadro N° X FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL MANDATARIO O DEL REPRESENTANTE COMÚN
Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio).


FIGUEROA PÉREZ, Martha
 Mandatario

Para uso de la Oficina receptora únicamente	
1. Fecha efectiva de recepción de la pretendida solicitud internacional: (11.06.2014)	2. Dibujos: <input type="checkbox"/> recibidos: <input type="checkbox"/> no recibidos:
3. Fecha efectiva de recepción, rectificada en razón de la recepción ulterior, pero dentro de plazo, de documentos o de dibujos que completen la pretendida solicitud internacional:	
4. Fecha de recepción, dentro de plazo, de las correcciones requeridas según el Artículo 11.2) del PCT:	
5. Administración encargada de la búsqueda internacional especificada por el solicitante: ISA /	6. <input type="checkbox"/> Transmisión de la copia para la búsqueda diferida hasta que se pague la tasa de búsqueda.

Para uso de la Oficina Internacional únicamente

Fecha de recepción del ejemplar original por la Oficina Internacional:

X. Coautoría en publicación: Microenvironmentally controlled secondary structure motifs of apolipoprotein A-I derived peptides. Mendoza-Espinosa P, Montalvan-Sorrosa D, García-González V, Moreno A, Rolando C, Mas-Oliva J (2014). *Mol Cell Biochem.* 393, 99-109.

Microenvironmentally controlled secondary structure motifs of apolipoprotein A-I derived peptides

Paola Mendoza-Espinosa · Danai Montalvan-Sorrosa ·
Victor García-González · Abel Moreno ·
Rolando Castillo · Jaime Mas-Oliva

Received: 29 December 2013 / Accepted: 2 April 2014 / Published online: 20 April 2014
© The Author(s) 2014. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract The structure of apolipoprotein A-I (apoA-I), the major protein of HDL, has been extensively studied in past years. Nevertheless, its corresponding three-dimensional structure has been difficult to obtain due to the frequent conformational changes observed depending on the microenvironment. Although the function of each helical segment of this protein remains unclear, it has been observed that the apoA-I amino (N) and carboxy-end (C) domains are directly involved in receptor-recognition, processes that determine the diameter for HDL particles. In addition, it has been observed that the high structural plasticity of these segments might be related to several amyloidogenic processes. In this work, we studied a series of peptides derived from the N- and C-terminal domains representing the most hydrophobic segments of apoA-I. Measurements carried out using circular dichroism in all tested peptides evidenced that the lipid environment promotes the formation of α -helical structures, whereas an aqueous environment facilitates a strong tendency to adopt β -sheet/disordered conformations. Electron microscopy

observations showed the formation of amyloid-like structures similar to those found in other well-defined amyloidogenic proteins. Interestingly, when the apoA-I peptides were incubated under conditions that promote stable globular structures, two of the peptides studied were cytotoxic to microglia and mouse macrophage cells. Our findings provide an insight into the physicochemical properties of key segments contained in apoA-I which may be implicated in disorder-to-order transitions that in turn maintain the delicate equilibrium between both, native and abnormal conformations, and therefore control its propensity to become involved in pathological processes.

Keywords Apolipoprotein A-I · Amyloidogenic peptides · Disorder-to-order transitions

Introduction

Apolipoprotein A-I (apoA-I) is considered the major component of high-density lipoproteins (HDL) and plays a key role in reverse cholesterol transport, a process that removes excess cholesterol from the cell membranes of peripheral tissues and, therefore, works as a protection mechanism against the development of atherosclerosis [1].

Natively unfolded proteins, such as apoA-I [2], have recently garnered significant interest and led to coin the term unfoldome [3]. Disordered domains in natively unfolded proteins have been associated with protein and lipid transport, transcriptional regulation [4], and a large number of diseases including amyloidosis, cancer, diabetes, and neurodegenerative disorders [5]. Nuclear magnetic resonance (NMR) and electron paramagnetic resonance (EPR) have demonstrated that the amino (N) and carboxy-end (C) segment of lipid-free apoA-I present variable

P. Mendoza-Espinosa · V. García-González · J. Mas-Oliva
Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México D.F., México

D. Montalvan-Sorrosa · R. Castillo
Instituto de Física, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México D.F., México

A. Moreno
Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México D.F., México

J. Mas-Oliva (✉)
División de Investigación, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México D.F., México
e-mail: jmas@ifc.unam.mx

secondary structures and, therefore, considerable plasticity [6–11].

Several HDL models that go from a discoidal to a spherical shape have suggested that the exposed N- and C-terminal domains of apoA-I interact with lipids [12–15], and shown that the presence of cholesterol and phospholipids determines whether the apoA-I structure is present in an open or closed conformation [6]. The highly hydrophobic C-terminal domain anchors apoA-I to membranes [16], whereas both the N- and C-terminal domains have been shown to play roles in receptor-dependent binding and lipid remodeling of discoidal HDL particles. Antibody binding and cross-linking studies have shown that the apoA-I N- and C-terminal domains interact with the scavenger receptor B1 (SRB1), responsible for the transfer of free cholesterol and cholesteryl-esters to the liver [17, 18]. On the other hand, we have recently shown that several α -helical peptides derived from the N- and C-terminal domains of apoA-I are able to activate the plasma enzyme lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) [19]. While several α -helical structures of apoA-I and their interactions with proteins and lipids have been widely studied, other protein structural features of apoA-I, such as β -sheets, have not been systematically investigated. From the few studies performed, site-directed spin-labeling electron paramagnetic resonance spectroscopy (SDSL-EPR) has revealed the presence of a short β segment at both the N- and the C-terminal regions of the lipid-free form of apoA-I [7, 20].

Although several of the conformational transitions in apoA-I are prone to be dependent on their microenvironment, little is known related to its capacity to acquire, depending on this microenvironment, a secondary structure susceptible to aggregation, such as globular forms and β -sheets.

The most hydrophobic and disordered segments of the N- and C-end regions of apoA-I were identified through *in silico* analysis performed for the complete apoA-I sequence. The physicochemical analysis included properties such as hydrophobic moment, charge, average hydrophobicity associated to steric zippers, theoretical average velocity of aggregation, and possible patterns including residues promoting membrane interactions, self-assembling and aggregation. According to these data, we studied the structural features of short peptides derived between N- and C-terminal domains of apoA-I. We identified several apoA-I modules that promote self-assembly and aggregation, and found that the positions of specific key aromatic residues may affect lipid binding. Our results shed light on the mechanisms that regulate localized conformational transitions that in turn might affect the way apoA-I interacts with HDL particles.

Materials and methods

Peptide synthesis and sample preparation

Three peptides were synthesized (purity > 98 %) based on the sequence and functional information reported: apoA-I [9–24]/D⁹-RVKDLATVYVDVLDK²⁴ (abbreviated in the present study as DRV^(9–24)), apoA-I[45–63]/K⁴⁵-LLDNWDSVTSTFSKLREQ⁶³ (abbreviated in the present study as KLL^(45–63)), and apoA-I[221–239]/V²²¹-LESFKVSFLSALEEYTKK²³⁹ (abbreviated in the present study as VLES^(221–239)) (GenScript Corporation Piscataway, NJ). Lyophilized peptides were dissolved at 1 mg/mL and diluted to a final concentration of 200 μ g/mL in ultrapure water (18.2 M Ω -cm, pH 6.8), in the presence of 20 mM 1-lauroyl-2-hydroxy-*sn*-glycero-3-phosphocholine (Lyso-C₁₂PC, CAS RN: 20559-18-6) or 40 % 2,2,2-trifluoroethanol (TFE, CAS RN: 75-89-8). Protein concentrations were determined measuring absorbance at 280 nm.

In silico analysis

The primary structure of apoA-I was placed into multiple algorithms to predict disorder-susceptible regions, hydrophobic clusters and aggregation-prone regions. The PONDR-FIT algorithm, a meta-predictor that joins the results of six programs (PONDR-VLXT, PONDR-VSL2, PONDR-VL3, FoldIndex, IUPred, and TopIDP) and forms an artificial consensus from these results, was used to predict conformational disorder [21]. Hydrophobic segments were predicted using the hydrophobic cluster analysis (HCA) server [22]. Regions prone to form amyloid fibrils and globular structures were predicted using the Zyggregator server [23]. Zyggregator uses an algorithm that considers patterns of hydrophobicity, as well as the polar and aromatic amino acid content of amyloidogenic proteins. The prediction of the aggregation rate was calculated using the equation of Dubay et al. [24], considering several factors that influence aggregation, such as pH, ionic force, the presence of specific amino acid sequences, net charge, and total hydrophobicity.

Circular dichroism spectroscopy

Far-ultraviolet (UV) circular dichroism (CD) spectra were recorded on an Aviv 62DS spectropolarimeter in a 0.1 cm quartz cell using an average time of 2.5 s and a step size of 0.5 nm over a wavelength range of 190–260 nm. Sample concentration was determined before each CD measurement and following baseline correction, ellipticity was converted to mean molar ellipticity (Θ , deg cm² dmol⁻¹). Secondary structure content was calculated at 190–260 nm

using the circular dichroism neural network (CDNN) based software [25].

Transmission electron microscopy and atomic force microscopy

Samples of peptide solutions in water were collected after 0, 24, 48, 72, 96 h and 120 days of incubation at 4 °C and observed using transmission electron microscopy (TEM) with a JEM-1200EX11 JEOL microscope (70 kV) and atomic force microscopy (AFM) performed with an AFM Digital Instruments/Veeco. Peptide solutions for TEM were deposited on carbon-coated transmission electron microscopy grids and stained with 2 % uranyl acetate. Aliquots of peptide solutions in water were deposited onto freshly cleaved mica, dried under laminar flow for 5 min, and visualized by AFM. Images were obtained using a Multimode microscope (Digital Instruments/Veeco) and a Nano Scope IIIa (Digital Instruments/Veeco) control system. Images ($5.0 \times 5.0 \mu\text{m}$) were obtained in contact mode at a scan frequency of 2 Hz using silicon nitride (Si_3N_4) AFM tips.

Viability assays and optical microscopy

RAW (mouse macrophage, ATCC CRL-2467) and EOC cells (mouse microglia, ATCC TIB-71) were grown as previously described by us [26]. Macrophage and microglial cells were placed into 96-well plates at a density of 1×10^4 cells/well (100 μL /well) and incubated for 24 h at 37 °C. Serial dilutions of aged peptide solutions (120 days at 4 °C) were prepared in Opti-MEM reduced-serum medium (OptiMEM) without phenol red. Incubations were performed for 20 h, and cell viability estimated by measuring the cellular reduction of MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) as previously described by us [26]. Cell images were observed by optical microscopy at 40 \times magnification, processed and stored as TIF using an Olympus IX71 microscope and the Image-Pro 3DS 6.0 software.

Results

In silico analysis of apoA-I and apoA-I-derived peptides

Using the PONDR-FIT algorithm, four disorder-prone regions (amino acids 1–13, 112–154, 204–210, 233–243) were identified in apoA-I (Fig. 1a). The disorder propensity graph shows that segments corresponding to peptides $\text{DRV}^{(9-24)}$ and $\text{VLES}^{(221-239)}$ present a higher tendency toward an unstructured conformation than the highly

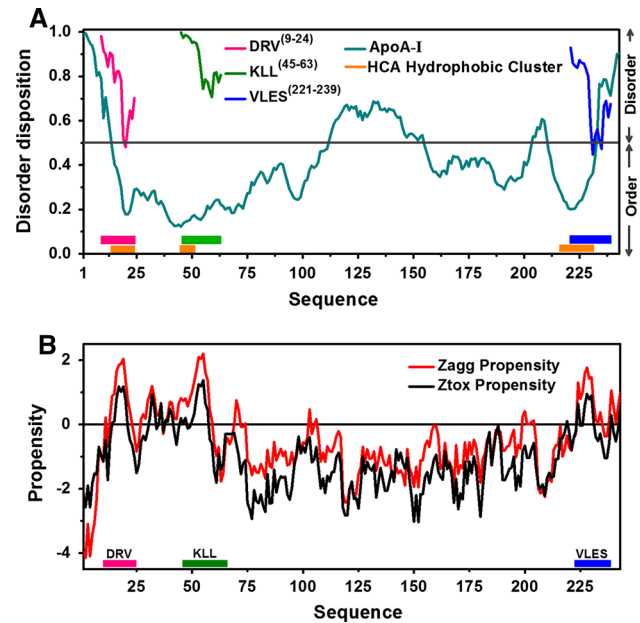


Fig. 1 Disorder and aggregation predictions for apoA-I. **a** The disorder profiles were created with PONDR-FIT and the hydrophobic clusters predicted using the HCA server. Propensities to disorder for $\text{DRV}^{(9-24)}$ and $\text{VLES}^{(221-239)}$ overlapped with the apoA-I disorder profile. **b** Aggregation profiles of apoA-I were obtained using Zyggregator and prediction of propensity to generate amyloid fibrils and globular structures using Zagg propensity and Ztox propensity respectively

ordered segment $\text{KLL}^{(45-63)}$. Nevertheless, when individual peptide sequences rather than the entire protein sequence were analyzed, we observed that peptide $\text{KLL}^{(45-63)}$ presented the highest tendency to become disordered (Fig. 1a). Using the HCA server, three highly hydrophobic segments (amino acids 13–22, 45–49, 216–232) were predicted that precisely correspond to $\text{DRV}^{(9-24)}$, $\text{KLL}^{(45-63)}$, and $\text{VLES}^{(221-239)}$ (Fig. 1a). In addition, Zyggregator identified several native apoA-I sites with the propensity to form amyloid fibrils and globular structures (amino acids 15–20, 50–57, and 224–230). These sites also correspond to peptides $\text{DRV}^{(9-24)}$, $\text{KLL}^{(45-63)}$, and $\text{VLES}^{(221-239)}$ (Fig. 1b). The theoretical prediction for aggregation rates (Zag propensity) indicates that peptide $\text{VLES}^{(221-239)}$ could form amyloid-like aggregates faster than the other peptides tested (Table 1).

Circular dichroism

Peptides $\text{DRV}^{(9-24)}$, $\text{KLL}^{(45-63)}$, and $\text{VLES}^{(221-239)}$ placed in water were monitored by far-UV CD at 24 h intervals (Fig. 2a–c) in the presence of 20 mM Lyso- C_{12}PC (cmc = 0.9 mM) or 40 % TFE (Fig. 2d–f). The percentages for the different secondary structural modules for these peptides were calculated employing the CDNN

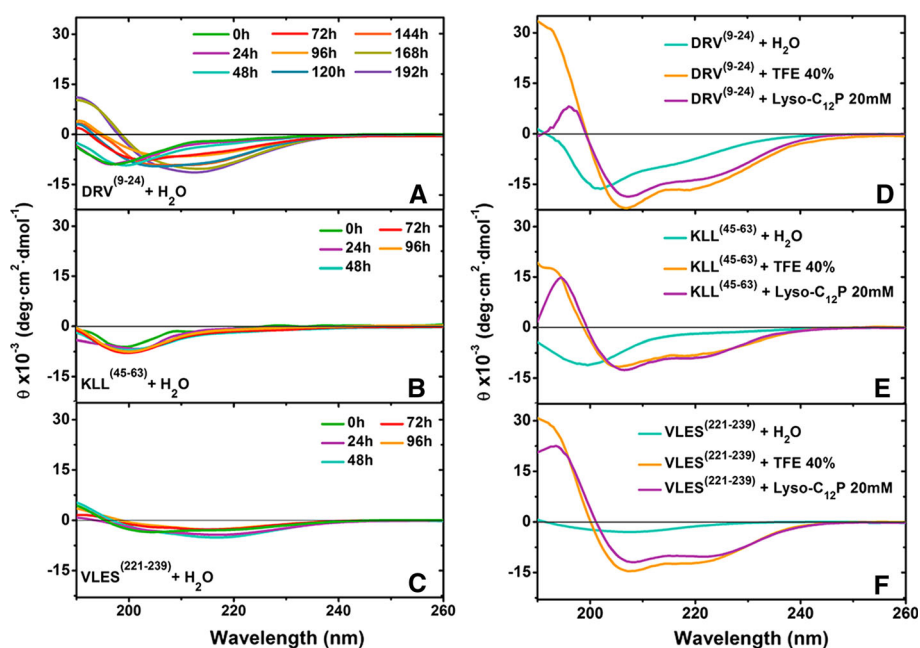
Table 1 Physicochemical properties of peptides DRV^(9–24), KLL^(45–63), and VLES^(221–239)

Peptide	DRV (9–24)	KLL (45–63)	VLES (221–239)
Amino acid sequence ^a	DRVKDLATVYVDVLKD	KLLDNWDSVTSTFSKLREQ	VLESFKVSFLSALEEYTKK
Average charge	−1	0	0
Average hydrophobicity (kcal/mol)	−0.116	−0.151	0.118
Hydrophobic moment μ_H (kcal/mol)	0.490	0.280	0.390
Steric zipper ^b hydrophobicity (kcal/mol)	0.675	0.218	0.664
Zag propensity $\log K(s^{-1})$	−4.3	−4.5	−3.2
Aromatic (X) and positive polar (P) amino acids position into the peptide sequence	P · P · · · · · X · · · · · P · P · · · · · X · · · · · X · P · P · ·	P · · · · · X · · · · · X · · · · · X · P · P · ·	· · · · · X · P · · · · · X · · · · · X · P · P ·
Globular structure formation	Yes	Yes	Yes
Fibril formation	Yes	No	Yes
Cytotoxicity	Medium	Poor	High

^a amino acids: positive (blue), negative (red), polar uncharged (green), aromatic (yellow)

^b The steric zipper is underlined

Fig. 2 Far-UV CD spectra of apoA-I derived peptides. **a–c** Spectra of peptide DRV^(9–24), KLL^(45–63), and VLES^(221–239) incubated for various times in water. **d–f** CD spectra of peptides DRV^(9–24), KLL^(45–63), and VLES^(221–239) incubated for 24 h in 40 % TFE and 20 mM Lyso-C₁₂PC



program (Table 2). CD spectra of peptides dissolved in water presented a single minimum around 200 nm at the 0 timepoint, indicating primarily the presence of disordered

structures. The CD spectra deconvolution of DRV^(9–24), KLL^(45–63), and VLES^(221–239) in water displayed a mixture of α -helix, β -sheet, and disordered structures (Table 2). In

Table 2 Secondary structure content of apoA-I derived peptides in water and in the presence of hydrophobic molecules

Sample	Incubation time (h)	PEPTIDES								
		DRV ^(9–24)			KLL ^(45–63)			VLES ^(221–239)		
		% α	% β	% rc	% α	% β	% rc	% α	% β	% rc
H ₂ O	0	6.6	35.3	38.4	4.5	38.2	35.4	8.5	46.0	28.6
	24	7.0	34.1	38.2	5.0	36.9	35.3	10.5	47.8	27.0
	48	7.3	32.3	38.4	5.1	36.4	35.2	11.1	45.2	27.7
	72	9.7	27.7	37.2	4.2	39.5	35.2	10.3	50.2	26.2
	96	11.2	26.9	36.4	4.0	41.2	35.2	10.3	46.0	27.6
	120	12.7	22.0	36.8						
	144	13.1	22.0	36.5						
	168	16.8	19.8	34.7						
	192	17.6	18.4	34.5						
TFE 40 %	24	47.2	0.6	26.7	26.3	19.4	28.0	39.5	2.7	25.0
Lyso-C ₁₂ PC 20 mM	24	26.8	3.9	46.3	24.2	13.4	28.0	34.0	5.9	26.0

TFE (2,2,2-Trifluoroethanol), Lyso-C₁₂PC (1-lauroyl-2-hydroxy-*sn*-glycero-3-phosphocholine). α (α -helix), β (β -sheet), rc (random coil). Secondary structure percentages were estimated using the circular dichroism neural network (CDNN) based software

the presence of Lyso-C₁₂PC and TFE, the three peptides showed a clear minimum at 208 and 222 nm and a maximum at 195 nm, characteristic of an α -helix (Fig. 2d–f). Lyso-C₁₂PC strongly promoted the recovery of secondary structure from a disordered conformation with all peptides tested. Optimal recoveries occurred with peptide VLES^(221–239), whereas the weakest one was shown by peptide KLL^(45–63) (Fig. 2d–f).

Peptide aggregates observed by TEM and AFM

Since an increase in β -sheet structures suggests the potential formation of amyloid-like fibrils, peptide samples were analyzed by TEM (Fig. 3) and AFM (Fig. 3 insets). This figure shows the different configurations that peptides VLES^(221–239) (Fig. 3a–f), DRV^(9–24) (Fig. 3g–l) and KLL^(45–63) (Fig. 3 m–r) display over time. Peptide VLES^(221–239) at 0 h revealed protofibrillar structures (arrows, Fig. 3a) that longitudinally grow after 24 h incubation (Fig. 3b). After 48, 72, and 96 h incubation (Fig. 3c–e), fibrillar or globular structures did not show any modification. However, after 120 days incubation, peptide VLES^(221–239) shows the formation of globular structures that significantly increased in size (Fig. 3f). Peptide DRV^(9–24) displayed a mixture of oligomers and protofibrillar intermediaries at the start of the experiment (Fig. 3g), whereas at 24 h incubation, we observed long fibrillar structures (Fig. 3h). After 48 and 72 h incubation, lateral aggregation of fibrils generated wider structures (Fig. 3i,j). At 96 h incubation, thick bundles of fibrillar structures were found with no additional changes in size seen after 120 days incubation (Fig. 3k,l). In contrast, no

fibrillar aggregates were seen during the incubation of KLL^(45–63) peptide over time (Fig. 3m–r).

MTT cell viability assay and optical microscopy

As previously reported by us employing the β -amyloid peptide, cytotoxic effects of aggregates formed by DRV^(9–24), KLL^(45–63) and VLES^(221–239) were evaluated on macrophage and microglial cells [27], following the reduction of MTT as an indirect indicator of cellular oxidative stress [28]. DRV^(9–24), KLL^(45–63) and VLES^(221–239) peptides were incubated for 120 days prior to viability testing. When macrophages were exposed to increasing concentrations of the three tested peptides, cell viability was only slightly decreased in the case of VLES^(221–239), with no dependence on peptide concentration (Fig. 4A). For the viability experiment performed with microglial cells, the peptide concentration range was expanded to 93 μ g/mL and a clear loss of cell viability was observed (Fig. 4B). Optical microscopy images shown in Fig. 4Ad and 4Bd depict clear morphological changes in both cell types treated with peptide VLES^(221–239). At the highest concentration tested, vacuolization was registered in macrophages employing 46 μ g VLES/mL and with 93 μ g VLES/mL for microglial cells. Modest cytotoxic effects were observed with both peptides DRV^(9–24) (Fig. 4Ab, Bb) and KLL^(45–63) (Fig. 4Ac, Bc). From these series of cell viability experiments in correlation to peptide aggregates shown by TEM and AFM, it becomes clear that VLES^(221–239) with the presence of small protofilaments associated to oligomers corresponds to the most toxic form of the peptide.

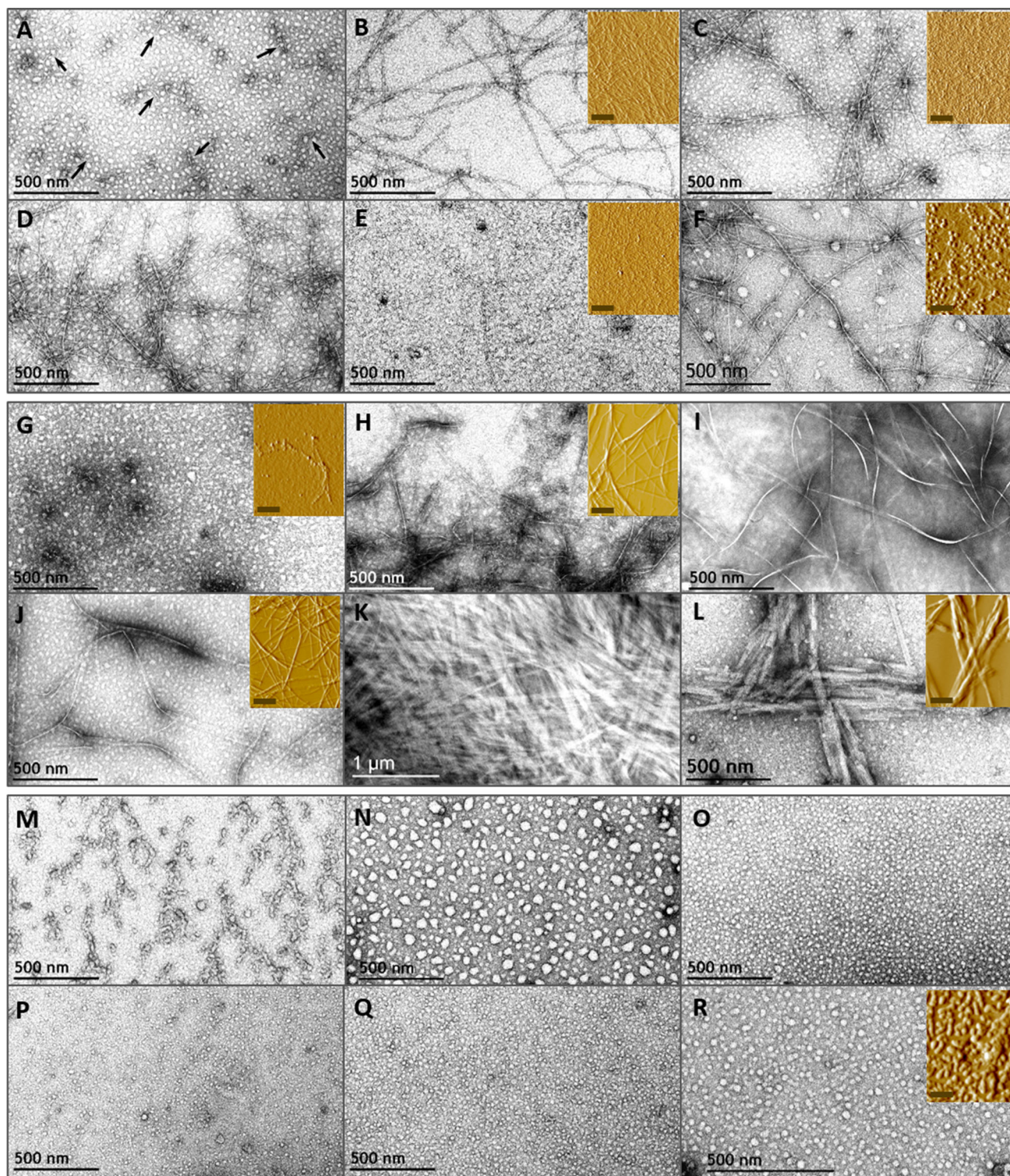
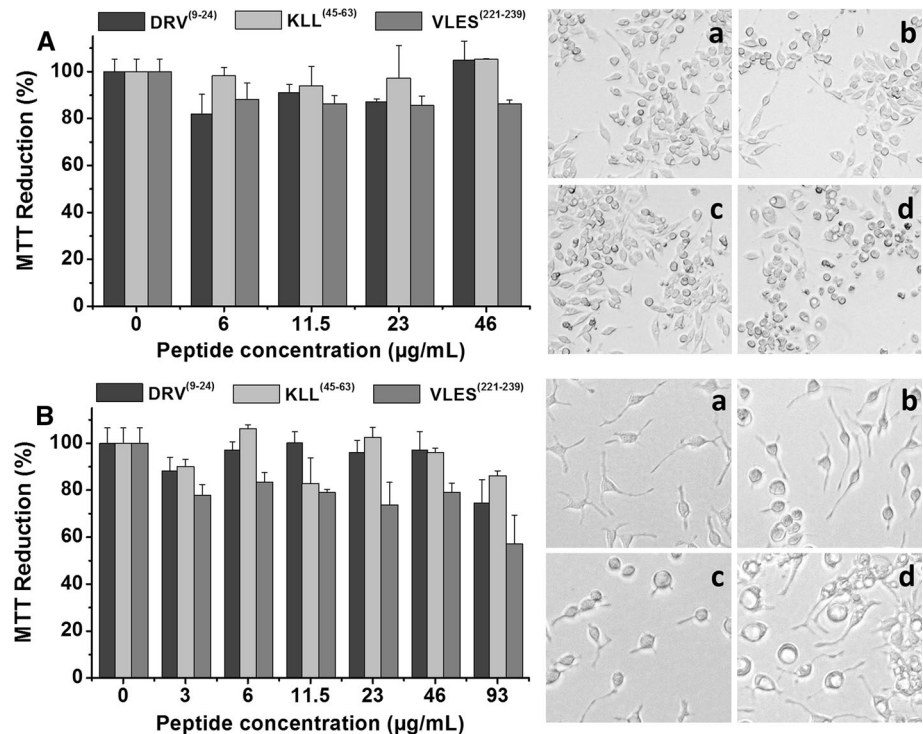


Fig. 3 TEM and AFM micrographs of peptides DRV^(9–24), KLL^(45–63), and VLES^(221–239). Evolution of peptide aggregation in water was evaluated by electron and atomic force microscopies on peptides VLES^(221–239) (A–F), DRV^(9–24) (G–L), and KLL^(45–63) (M–R). Incubation times correspond to: 0 h (A, G, M), 24 h (B, H, N), 48 h

(C, I, O), 72 h (D, J, P), 92 h (E, K, Q), and 120 days (F, L, R). Arrows (A) show protofibrillar structures. Insets correspond to AFM images of samples used in CD experiments and the scale correspond to 1 μ m

Fig. 4 Cytotoxic effects of apoA-I derived peptides. MTT reductions experiments performed with macrophage (A) and microglial cells (B). **Aa-d** Optical microscopy images of macrophages treated for 24 h with peptides previously incubated at 4 °C in water for 120 days (46 µg/mL). **Ba-d** Optical microscopy images of microglial cells treated for 24 h with peptides previously incubated at 4 °C in water for 120 days (93 µg/mL). **a** Control without peptides, **b** DRV⁽⁹⁻²⁴⁾, **c** KLL⁽⁴⁵⁻⁶³⁾, and **d** VLES⁽²²¹⁻²³⁹⁾



Discussion

In 1950, Karush [29] proposed that protein–ligand interactions stabilized the best-fitting members within an assembly of structures in equilibrium. Since then, numerous studies have demonstrated that disorder and flexibility in protein structure are important features in the understanding of protein function. In the case of apolipoproteins such as apoA-I, apoC-II, and apoE, it has been found that they correspond to intrinsically disordered proteins. As a consequence of their structural flexibility, the X-ray crystal structure of the C-terminal apoA-I has shown its propensity to destabilization as well as to be able to adopt different conformations when associated to lipids or in a lipid-free state [30, 31]. The crystal structure of lipid-free apoA-I demonstrated that although it contains a largely helical four-segment bundle [31], when in solution, this segment adopts a molten globule conformation with its N-terminal domain completely disordered [7].

When apolipoproteins are exposed to air/water and lipid/water interfaces, evident disorder-to-order conformational transitions take place that might have an important impact upon HDL function [32–34]. In this sense, we have previously shown that conformational transitions observed with a series of apoA-I derived peptides stabilize and improve the enzymatic activity of LCAT [19].

In order to predict which segments of apoA-I could present the greater propensity to develop disorder-to-order transitions, using the PONDR-FIT server, we have studied

three segments that bind to lipids and acquire a helical conformation that might contribute to the stabilization of lipid-protein interaction. Within each of the disordered N- and C-terminal domains, small segments of hydrophobic β -sheet structure are exposed and, therefore, proposed to interact with lipids [7, 20]. Our analysis using the HCA server revealed three highly hydrophobic clusters within the helical structure of apoA-I, being the longest one found at the C-terminal domain. This result supports our previous reports and also suggests that lipid-free apoA-I first binds membrane lipids or surface lipids of lipoproteins through the C-terminal fragment. The presence of nonpolar core residues in the protein may be related with this phenomenon, which does not occur when proteins have an inadequate number of hydrophobic residues.

Peptides studied in this investigation have the particular feature of having a good balance between charge and hydrophobicity that allows them to stay “suspended” as globular structures and due to hydrophobic interactions bound together with the potential to generate fibrillar structures. While peptide DRV⁽⁹⁻²⁴⁾ having a charge of -1 presents the ability to easily generate amyloid-like fibers as previously reported by us [27], peptide VLES⁽²²¹⁻²³⁹⁾ with no charge at physiological pH, only form thin protofibrils. Peptide KLL⁽⁴⁵⁻⁶³⁾ also presenting a net charge of 0 at physiological pH, shows a low efficiency for intermolecular interactions and, therefore, a low propensity for the generation of fibrils.

Peptides and proteins capable of generating amyloid fibers present common hydrophobic structural blocks

called “steric zippers” [35]. Interestingly, DRV^(9–24) in addition to presenting the highest μH , also contains a “steric zipper” with the highest average hydrophobicity value when compared to peptides KLL^(45–63) and VLES^(221–239). Although peptide KLL^(45–63) is the most polar of the three peptides tested, it also contains a “steric zipper” showing weaker hydrophobic characteristics than those present in peptides DRV^(9–24) and VLES^(221–239). This characteristic indicates the absence of an adequate nucleation center that might self-assemble and, therefore, the difficulty to generate fibrillar structures. CD spectra deconvolution for peptides DRV^(9–24) and VLES^(221–239) suspended in water, showed over time a moderate increase in α -helix content despite microscopy evidence of fibril formation (Table 2). CD spectra deconvolution for peptide KLL^(45–63) suggests that the formation of β -sheet structures alone is insufficient to induce protein aggregation and fibril formation. On the other hand, the use of the software Zyggregator predicted that propensity for amyloid-like fibril formation was similar for peptides DRV^(9–24), KLL^(45–63), and VLES^(221–239) (Fig. 2b).

We recognize three elemental features in peptides DRV^(9–24) and VLES^(221–239) that lead to protein aggregation. In the first place, peptides present a steric zipper characteristic of amyloidogenic proteins in the form of tandems of hydrophobic and nonpolar amino acids (Table 1). Second, the presence of aromatic amino acids, in particular phenylalanine, is related with self-assembly of amyloid fibrils. Finally, we observed a size uniformity of the steric zipper and adjacent regions, a property related to protein–protein interactions that drive amyloid-like formation. The existence of unstructured segments at the N- and C-terminal domains of apoA-I makes the protein susceptible to enzymatic hydrolysis [36], phenomenon that increases the probability for the generation of highly hydrophobic autoimmune structures that in turn might induce an inflammatory response [33, 37, 38] promoting the generation of nucleation centers important in the formation of amyloid-like fibrils (Fig. 5) [39–42]. In addition, under proteolytic conditions, it has been observed that apoA-I/HDL releases peptides from its terminal domains showing the same properties as when they are in a lipid medium [43, 44]. During our viability assays, peptide VLES^(221–239) and to a lesser extent DRV^(9–24), the two peptides that generate fibers, have the ability to promote cytotoxicity. VLES^(221–239) also presents the property to alter the cell membrane as observed by optical microscopy (Fig. 4Bd). Conducting an analysis of peptide sequence motifs capable of interacting with membranes or phospholipidic surfaces [45, 46], it is observed that peptide DRV^(9–24) presents amino acids with a net positive charge (lysine and arginine) and aromatic amino acids. Interestingly, peptide KLL^(45–63) showing a lysine residue at the

N-terminal, two aromatic amino acids, and several non-polar residues resembling the phospholipid polar head might promote the formation of “peptide micelles” [47]. It has been established that electrostatic interactions between positive residues located at the protein and the presence of negatively charged phospholipids, are the dominant forces that promote adsorption of the protein onto the membrane surface [48]. On the other hand, nonpolar interactions between hydrophobic segments of the protein and the presence of lipid hydrophobic chains, lead to the insertion of the protein into the membrane interface [45]. In our hands, incubation of cells in a medium containing VLES^(221–239) showing an α -helical structure when associated to lipid molecules, seems to be the conformation that mostly damage cells [40, 49]. From the images seen with TEM and AFM, it can be concluded that the presence of VLES^(221–239) in the form of small protofilaments and oligomers corresponds to structural forms associated to a high degree of cytotoxicity.

Based on the conformational transitions and cytotoxicity associated to the apoA-I derived peptides used in this work, we suggest that transitions leading to an α -helix formation in this protein at the hydrophilic/hydrophobic interface of membranes can be considered a key feature to explain cell toxicity.

Our study puts into perspective the fact that highly hydrophobic segments of apoA-I present the ability to develop secondary structure disorder-to-order transitions depending on the molecules to which it is associated. The association of these highly hydrophobic segments to specific types of lipid molecules could shift the equilibrium toward the consolidation of α -helical segments that would apparently warranty the normal function of the protein. In contrast, if these segments follow protein–protein interactions or are kept in highly hydrophilic environments, the possibility for the generation of localized pro-aggregation structures might disrupt the normal function of apoA-I.

The dynamic structure exhibited by apoA-I basically supported by intrinsically disordered exposed segments that undergo disorder-to-order and order-to-disorder conformational transitions might also explain the exchangeability properties shown by this family of apolipoproteins. When the protein is located in a highly hydrophilic media with its lateral segments exposed, these segments mostly show a disordered conformation and the permanence of the protein in plasma maintained. Nevertheless, when these segments start to get associated to lipid, there is a shift toward organized secondary conformational structures mostly α -helical structures that in a continuum tend to change the equilibrium, toward the formation and consolidation of lipid loaded particles that eventually give rise to the generation of HDL.

For many years, protein function had resided in the fact that well-ordered structures mostly through rigid

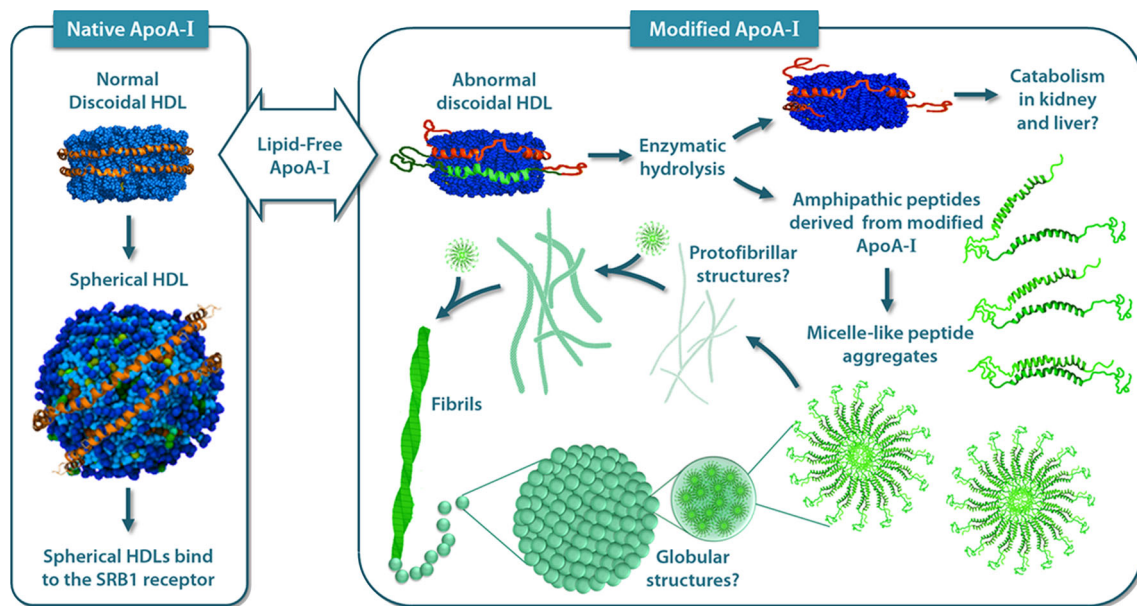


Fig. 5 ApoA-I aggregation properties. Lipid-poor apoA-I interacts with the ABCA1 receptor and produce discoidal structures following a process still under active investigation. Discoidal particles are transformed into spherical HDLs by the action of the LCAT enzyme [39]. Only the spherical forms of HDL can interact with the SRB1 receptor. Modified apoA-I can not interact properly with the ABCA1 receptor forming smaller abnormal discoidal HDLs [40]. A direct

consequence of this condition is the exposure of highly unstructured apoA-I segments prone to enzymatic hydrolysis [41]. Peptides released by proteolysis might form amyloidogenic structures that can be organized first as micelle-like peptides that can evolve to form globular or protofibrillar structures depending on their residue composition [42, 47]. Modified from [33]

tridimensional blocks were fundamental for understanding the way proteins work. Nevertheless, nowadays this concept has been surpassed when recognition has been made to phylogenetically advanced organisms that develop function through and important number of intrinsically disordered proteins and the concept of structural disorder, as a new form of secondary structure of proteins conceived. In this sense, an important number of diseases that in the past had been difficult to understand, during the present days they start to find an explanation in the anomalous folding of proteins [50]. Without a doubt, we can say that, in the near future many diseases with poorly understood origins not only will find a molecular explanation based on this phenomenon, but also in the way intrinsically disordered regions of proteins are modulated.

Acknowledgments We thank B. Delgado-Coello and R. Paredes for their excellent technical assistance. This work was supported by CONACyT (Grant 180726) and DGAPA-UNAM (Grant RR205711) awarded to J. Mas-Oliva. P. Mendoza-Espinosa, D. Montalvan-Sorrosa (Biomedical Sciences) and V. García-González (Biochemical Sciences) were supported by a fellowship granted by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for Ph.D studies at Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License which permits any use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and the source are credited.

References

- Barter PJ, Rye KA (1996) Molecular mechanisms of reverse cholesterol transport. *Curr Opin Lipidol* 7:82–87
- Uversky VN, Gillespie JR, Fink AL (2000) Why are “natively unfolded” proteins unstructured under physiologic conditions? *Proteins* 41:415–427
- Dunker AK, Oldfield CJ, Meng J, Romero P, Yang JY, Chen JW, Vacic V, Obradovic Z, Uversky VN (2008) The unfoldomics decade: an update on intrinsically disordered proteins. *BMC Genomics* 9(Suppl 2):S1. doi:10.1186/1471-2164-9-S2-S1
- Tompa P (2012) Intrinsically disordered proteins: a 10-year recap. *Trends Biochem Sci* 37:509–516. doi:10.1016/j.tibs.2012.08.004
- Mendoza-Espinosa P, Garcia-Gonzalez V, Moreno A, Castillo R, Mas-Oliva J (2009) Disorder-to-order conformational transitions in protein structure and its relationship to disease. *Mol Cell Biochem* 330:105–120. doi:10.1007/s11010-009-0105-6
- Kono M, Okumura Y, Tanaka M, Nguyen D, Dhanasekaran P, Lund-Katz S, Phillips MC, Saito H (2008) Conformational flexibility of the N-terminal domain of apolipoprotein A-I bound to spherical lipid particles. *Biochemistry* 47:11340–11347. doi:10.1021/bi801503r
- Lagerstedt JO, Budamagunta MS, Oda MN, Voss JC (2007) Electron paramagnetic resonance spectroscopy of site-directed spin labels reveals the structural heterogeneity in the N-terminal domain of apoA-I in solution. *J Biol Chem* 282:9143–9149. doi:10.1074/jbc.M608717200
- Wang G, Sparrow JT, Cushley RJ (1997) The helix–hinge–helix structural motif in human apolipoprotein A-I determined by NMR spectroscopy. *Biochemistry* 36:13657–13666. doi:10.1021/bi971151q

9. Wang G, Treleaven WD, Cushley RJ (1996) Conformation of human serum apolipoprotein A-I(166–185) in the presence of sodium dodecyl sulfate or dodecylphosphocholine by ¹H-NMR and CD: evidence for specific peptide-SDS interactions. *Biochim Biophys Acta* 1301:174–184
10. Okon M, Frank PG, Marcel YL, Cushley RJ (2002) Heteronuclear NMR studies of human serum apolipoprotein A-I. Part I: secondary structure in lipid-mimetic solution. *FEBS Lett* 517:139–143
11. Okon M, Frank PG, Marcel YL, Cushley RJ (2001) Secondary structure of human apolipoprotein A-I(1–186) in lipid-mimetic solution. *FEBS Lett* 487:390–396
12. Wu Z, Wagner MA, Zheng L, Parks JS, Shy JM 3rd, Smith JD, Gogonea V, Hazen SL (2007) The refined structure of nascent HDL reveals a key functional domain for particle maturation and dysfunction. *Nat Struct Mol Biol* 14:861–868. doi:10.1038/nsmb1284
13. Gogonea V, Gerstenecker GS, Wu Z, Lee X, Topbas C, Wagner MA, Tallant TC, Smith JD, Callow P, Pipich V, Malet H, Schoehn G, DiDonato JA, Hazen SL (2013) The low-resolution structure of nHDL reconstituted with DMPC with and without cholesterol reveals a mechanism for particle expansion. *J Lipid Res* 54(4):966–983. doi:10.1194/jlr.M032763
14. Gogonea V, Wu Z, Lee X, Pipich V, Li XM, Ioffe AI, DiDonato JA, Hazen SL (2010) Congruency between biophysical data from multiple platforms and molecular dynamics simulation of the double-super helix model of nascent high-density lipoprotein. *Biochemistry* 49:7323–7343. doi:10.1021/bi100588a
15. Wu Z, Gogonea V, Lee X, Wagner MA, Li XM, Huang Y, Undurti A, May RP, Haertlein M, Moulin M, Gutsche I, Zaccari G, DiDonato JA, Hazen SL (2009) Double superhelix model of high density lipoprotein. *J Biol Chem* 284(52):36605–36619. doi:10.1074/jbc.M109.039537
16. Fang Y, Gursky O, Atkinson D (2003) Lipid-binding studies of human apolipoprotein A-I and its terminally truncated mutants. *Biochemistry* 42:13260–13268. doi:10.1021/bi0354031
17. Huang W, Sasaki J, Matsunaga A, Han H, Li W, Koga T, Kugi M, Ando S, Arakawa K (2000) A single amino acid deletion in the carboxy terminal of apolipoprotein A-I impairs lipid binding and cellular interaction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:210–216
18. Allan CM, Fidge NH, Kanellos J (1992) Antibodies to the carboxyl terminus of human apolipoprotein A-I. The putative cellular binding domain of high density lipoprotein 3 and carboxyl-terminal structural homology between apolipoproteins A-I and A-II. *J Biol Chem* 267(19):13257–13261
19. Aguilar-Espinosa SL, Mendoza-Espinosa P, Delgado-Coello B, Mas-Oliva J (2013) Lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) activity in the presence of Apo-AI-derived exposed to disorder-to-order conformational transitions. *Biochem Biophys Res Commun* 441:469–475
20. Oda MN, Forte TM, Ryan RO, Voss JC (2003) The C-terminal domain of apolipoprotein A-I contains a lipid-sensitive conformational trigger. *Nat Struct Biol* 10:455–460. doi:10.1038/nsb931
21. Xue B, Dunbrack RL, Williams RW, Dunker AK, Uversky VN (2010) PONDR-FIT: a meta-predictor of intrinsically disordered amino acids. *Biochim Biophys Acta* 1804:996–1010. doi:10.1016/j.bbapap.2010.01.011
22. Callebaut I, Labesse G, Durand P, Poupon A, Canard L, Chomilier J, Henrissat B, Moron JP (1997) Deciphering protein sequence information through hydrophobic cluster analysis (HCA): current status and perspectives. *Cell Mol Life Sci* 53:621–645
23. Tartaglia GG, Pawar AP, Campioni S, Dobson CM, Chiti F, Vendruscolo M (2008) Prediction of aggregation-prone regions in structured proteins. *J Mol Biol* 380:425–436. doi:10.1016/j.jmb.2008.05.013
24. DuBay KF, Pawar AP, Chiti F, Zurdo J, Dobson CM, Vendruscolo M (2004) Prediction of the absolute aggregation rates of amyloidogenic polypeptide chains. *J Mol Biol* 341:1317–1326. doi:10.1016/j.jmb.2004.06.043
25. Bohm G, Muhr R, Jaenicke R (1992) Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Eng* 5:191–195
26. Manzano-Leon N, Delgado-Coello B, Guaderrama-Diaz M, Mas-Oliva J (2006) Beta-adaptin: key molecule for microglial scavenger receptor function under oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* 351:588–594. doi:10.1016/j.bbrc.2006.10.077
27. Garcia-Gonzalez V, Mas-Oliva J (2011) Amyloidogenic properties of a D/N mutated 12 amino acid fragment of the C-terminal domain of the cholesteryl-ester transfer protein (CETP). *Int J Mol Sci* 12:2019–2035. doi:10.3390/ijms12032019
28. Abe K, Saito H (1999) Both oxidative stress-dependent and independent effects of amyloid beta protein are detected by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction assay. *Brain Res* 830:146–154
29. Karush F (1950) Heterogeneity of the binding sites of bovine serum albumin. *J Am Chem Soc* 72:2705–2713. doi:10.1021/Ja01162a099
30. Borhani DW, Rogers DP, Engler JA, Brouillette CG (1997) Crystal structure of truncated human apolipoprotein A-I suggests a lipid-bound conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:12291–12296
31. Mei X, Atkinson D (2011) Crystal structure of C-terminal truncated apolipoprotein A-I reveals the assembly of high density lipoprotein (HDL) by dimerization. *J Biol Chem* 286(44):38570–38582. doi:10.1074/jbc.M111.260422
32. Xicohtencatl-Cortes J, Mas-Oliva J, Castillo R (2004) Phase transitions of phospholipid monolayers penetrated by apolipoproteins. *J Phys Chem B* 108:7307–7315
33. Campos-Terán J, Mendoza-Espinosa P, Castillo R, Mas-Oliva J (2012) conformational and disorder to order transitions in proteins: structure/function correlation in apolipoproteins. In: Cai W, Hong H (eds) Protein–protein interactions—computational and experimental tools. Intech, Rijeka, pp 331–358. doi:10.5772/37217
34. Mendoza-Espinosa P, Moreno A, Castillo R, Mas-Oliva J (2008) Lipid dependant disorder-to-order conformational transitions in apolipoprotein CI derived peptides. *Biochem Biophys Res Commun* 365:8–15. doi:10.1016/j.bbrc.2007.10.112
35. Nelson R, Sawaya MR, Balbirnie M, Madsen AO, Riekel C, Grothe R, Eisenberg D (2005) Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils. *Nature* 435:773–778. doi:10.1038/nature03680
36. Gursky O, Mei X, Atkinson D (2012) The crystal structure of the C-terminal truncated apolipoprotein A-I sheds new light on amyloid formation by the N-terminal fragment. *Biochemistry* 51(1):10–18. doi:10.1021/bi2017014
37. Lee M, Kovanen PT, Tedeschi G, Oungre E, Franceschini G, Calabresi L (2003) Apolipoprotein composition and particle size affect HDL degradation by chymase: effect on cellular cholesterol efflux. *J Lipid Res* 44:539–546. doi:10.1194/jlr.M200420-JLR200
38. Seong SY, Matzinger P (2004) Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat Rev Immunol* 4(6):469–478. doi:10.1038/nri1372
39. Toth PP (2003) Reverse cholesterol transport: high-density lipoprotein’s magnificent mile. *Curr Atheroscler Rep* 5:386–393
40. Genschel J, Haas R, Pröpsting MJ, Schmidt HHJ (1998) Hypothesis: apolipoprotein A-I induced amyloidosis. *FEBS Lett* 430:145–149. doi:10.1016/S0014-5793(98)00668-1

41. Ramella NA, Rimoldi OJ, Prieto ED, Schinella GR, Sanchez SA, Jaureguiberry MS, Vela ME, Ferreira ST, Tricerri MA (2011) Human apolipoprotein A-I-derived amyloid: its association with atherosclerosis. *PLoS One* 6:e22532. doi:[10.1371/journal.pone.0022532](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022532)
42. Abedini A, Raleigh DP (2009) A critical assessment of the role of helical intermediates in amyloid formation by natively unfolded proteins and polypeptides. *Protein Eng Des Sel* 22:453–459. doi:[10.1093/protein/gzp036](https://doi.org/10.1093/protein/gzp036)
43. Gillotte KL, Davidson WS, Lund-Katz S, Rothblat GH, Phillips MC (1996) Apolipoprotein A-I structural modification and the functionality of reconstituted high density lipoprotein particles in cellular cholesterol efflux. *J Biol Chem* 271(39):23792–23798
44. Mishra VK, Palgunachari MN, Datta G, Phillips MC, Lund-Katz S, Adeyeye SO, Segrest JP, Anantharamaiah GM (1998) Studies of synthetic peptides of human apolipoprotein A-I containing tandem amphipathic alpha-helices. *Biochemistry* 37(28):10313–10324. doi:[10.1021/bi980042o](https://doi.org/10.1021/bi980042o)
45. McGaughey GB, Gagne M, Rappe AK (1998) pi-Stacking interactions. Alive and well in proteins. *J Biol Chem* 273(25):15458–15463
46. Palgunachari MN, Mishra VK, Lund-Katz S, Phillips MC, Adeyeye SO, Alluri S, Anantharamaiah GM, Segrest JP (1996) Only the two end helices of eight tandem amphipathic helical domains of human apo A-I have significant lipid affinity. Implications for HDL assembly. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16(2):328–338
47. Kumaraswamy P, Sethuraman S, Krishnan UM (2013) Hierarchical self-assembly of Tjernberg peptide at nanoscale. *Soft Matter* 9:2684–2694. doi:[10.1039/C2sm27143e](https://doi.org/10.1039/C2sm27143e)
48. Splith K, Neundorf I (2011) Antimicrobial peptides with cell-penetrating peptide properties and vice versa. *Eur Biophys J* 40(4):387–397. doi:[10.1007/s00249-011-0682-7](https://doi.org/10.1007/s00249-011-0682-7)
49. Quist A, Doudevski I, Lin H, Azimova R, Ng D, Frangione B, Kagan B, Ghiso J, Lal R (2005) Amyloid ion channels: a common structural link for protein-misfolding disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(30):10427–10432. doi:[10.1073/pnas.0502066102](https://doi.org/10.1073/pnas.0502066102)
50. García-González V, Mas-Oliva J (2012) *El Concepto de Enfermedad Asociado a la Conformación de Proteínas*, 1st edn. Universidad Nacional Autónoma de México and *El Manual Moderno*, México. ISBN 978-607-02-3363-0