

11281



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

**INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**“BIOFÍSICA DE APOPROTEÍNAS: RELACIÓN  
ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE UNIÓN  
A LÍPIDOS”**

**T R A B A J O   D E   T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**  
**DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**P R E S E N T A:**  
**BIOL. JUAN XICOHTENCATL CORTES**

**D I R E C T O R   D E   T E S I S**  
**DR. JAIME MAS OLIVA**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, MÉXICO, D.F., 2005**

m. 33 9907



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.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e internet el contenido de mi trabajo recacional.

NOMBRE:

*Irma Quintana del Real*

FECHA:

*11 de mayo 2005*

FIRMA:

*[Firma manuscrita]*

*A la Universidad Nacional Autónoma de México*

**UNAM**

*Al Comité Tutorial integrado por los investigadores:*

*Dr. Jaime Mas Oliva*

*Dr. Rolando Castillo Caballero*

*Dr. Abel Moreno Cárcamo.*

*Al Jurado de Examen a su vez integrado por los siguientes investigadores:*

*Dra. María Esther Brandan Siqués (Inst. de Física)*

*Dra. Adela Rodríguez Romero (Inst. de Química)*

*Dra. Alicia Ortega Aguilar (Facultad de Medicina)*

*Dr. Armando Gómez Puyou (Inst. de Fisiología celular)*

*Dr. Manuel Soriano García (Inst. de Química)*

*Dr. Víctor Romero Rochín (Inst. de Física)*

*Dr. Ernest Giralt Lledo (Parc Científic de Barcelona)*

*A mi hija que es todo en la vida, por darme la posibilidad de ser padre, por ser la luz que ilumina mi camino y que me llena de esperanza para ser cada día mejor.*

*A mi esposa, por ser la compañera ideal, mi mejor amiga, quien siempre ha estado en mi corazón, por ser incondicional, por su gran amor, apoyo, por darle luz y felicidad a mi vida.*

*A mis padres, Emma y Luis por su gran amor y apoyo.*

*A mis hermanos Alejandro, Isabel, Verónica, Yaneth, Micaela y Oscar.*

*A Luz María García y Blanca Delgado, quienes siempre me brindaron su apoyo en momentos difíciles, las quiero mucho.*

## **AGRADECIMIENTOS**

*Agradezco profundamente al Dr. Jaime Mas Oliva por su enorme paciencia para dirigirme en el proyecto, por su respeto, por su gran entusiasmo y por su confianza. Dr. Mas-Oliva es un enorme placer trabajar con usted y los logros alcanzados en mi formación académica es gracias a usted.*

*Al Dr. Rolando Castillo Caballero por sus sabios consejos y por haberme brindado el tiempo, espacio y sus conocimientos valiosos.*

*Al M. en C. Salvador Ramos Solórzano por su gran apoyo académico y experimental, lo cual permitió de manera fundamental la realización de esta tesis.*

*A la M. en C. Blanca Alicia Delgado Coello por su apoyo en el uso de técnicas experimentales en el laboratorio y en el análisis de resultados, mostrando un enorme entusiasmo para la realización de este trabajo.*

*A María Elena Gutiérrez por su gran apoyo en la redacción de esta tesis.*

*A mis amigos de toda la vida: Jorge Girón, Nurit, Gaby López, Luz María, Cesar, Erica, Eliud, Guadalupe, Fabián, Daniel y Martha.*

*A mis amigos de Fisiología Celular: Lucía, Vicky, Maggy, Blanca, Salvador, Ernesto, Rodrigo, Juan Antonio, Marco, la Sra. Lupita, Malena y Carmen.*

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y a la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) por el financiamiento recibido como becario (# de becaria CONACyT 144302).*

## ÍNDICE

Lista de abreviaturas .....	VIII
Resumen .....	XI
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
Características de las apolipoproteínas intercambiables humanas .....	2
Apolipoproteína CI .....	4
Apolipoproteína AII .....	5
Apolipoproteína AI .....	6
Apolipoproteína CIII .....	7
Apolipoproteína E .....	8
Referencias .....	9
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>18</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>20</b>
Predicción de estructura secundaria .....	21
Cálculo del momento hidrofóbico .....	21
Reconstitución de las apolipoproteínas en solución de fosfatos .....	22
Reconstitución del fosfolípido en cloroformo .....	22
Cuantificación de proteína .....	23
Determinación de los tipos y porcentajes de estructura secundaria de las diferentes apolipoproteínas mediante dicroísmo circular .....	23
Monocapa de Langmuir .....	26
Determinación de la presión lateral .....	27

Isotermas .....	30
Microscopio de ángulo de Brewster .....	30
Preparación de las monocapas de Langmuir de las diferentes apolipoproteínas .....	32
Preparación de monocapas binarias de DPPC con apolipoproteínas CI y AII .....	33
Características generales de una película de Langmuir-Blodgett .....	34
Preparación de películas hidrofílicas de LB de las apolipoproteínas CI y AII .....	34
Preparación de monocapas hidrofóbicas de octadeciltrióxido de silano .....	35
Preparación de películas hidrofóbicas de LB de las apolipoproteínas CI y AII .....	35
Microscopía de fuerza atómica .....	36
Observaciones con el microscopio de fuerza atómica .....	39
Referencias .....	41
<b>RESULTADOS I</b> .....	<b>43</b>
Predicción de regiones hélices $\alpha$ de las apolipoproteínas AII, CIII, E3 y AI .....	44
Regiones hélices $\alpha$ anfipáticas .....	46
Giros helicoidales .....	47
Estimación del contenido de estructura secundaria de las diferentes apolipoproteínas .....	54
Monocapas de Langmuir de las apolipoproteínas intercambiables humanas .....	62
Isotermas y Observaciones de MAB de las monocapas de Gibbs .....	73
Referencias .....	76
<b>RESULTADOS II</b> .....	<b>77</b>
Monocapas de Langmuir de OTE .....	78
Imágenes de microscopía de ángulo de Brewster .....	78
Imágenes de microscopía de fuerza atómica .....	80
Películas hidrofílicas de LB de las apolipoproteínas CI y AII .....	85
Películas hidrofóbicas de LB de las apolipoproteínas CI y AII .....	89
Modelo de la apolipoproteína CI .....	95
Modelo de la apolipoproteína AII .....	96
Referencias .....	100

<b>RESULTADOS III</b> .....	101
Descripción de las monocapas de Langmuir de fosfolípidos .....	102
Isotermas y observaciones con MAB de la monocapa de DPPC.....	104
Penetración de las apolipoproteínas dentro de monocapas de DPPC.....	104
Área que ocupan las apolipoproteínas CI y AII en la interfase lípido/agua .....	111
Transiciones de fase de las monocapas binarias lípido/proteína .....	115
Referencias .....	127
<b>DISCUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS</b> .....	129
Referencias .....	135



## LISTA DE ABREVIATURAS

$N_o$	número de moléculas de proteínas en la monocapa
$\delta$	ángulo expresado en radianes
$\epsilon$	coeficiente de absorción molar
$\Pi$	presión lateral
$[\theta_{\text{experimental}}]$	elipticidad observada
$\Delta G$	cambio en la energía libre de Gibbs
$\mu H$	momento hidrofóbico
$\mu H_{\text{prom}}$	momento hidrofóbico promedio
$\mu m$	micrómetro
A	absorbancia
ATP	adenosin trifosfato
ABCA-1	proteína cassette unidora de ATP (ATP binding cassette protein)
$\text{\AA}$	amstrong
A	área
A'	área previamente cubierta por el fosfolípido
$A^p$	incremento del área debido a la penetración de la proteína
Apos	apolipoproteínas o apoproteínas
$a_s$	área por proteína
C	concentración
CETP	proteína transferidora de esteres de colesterol
cm	centímetro
$\text{cm}^2$	centímetro al cuadrado
Da	daltones
DC	dicroísmo circular
DMPC	1,2-dimiristoil fosfatidilcolina
DPPC	1,2-Dipalmitoil-sn-glicerol-3-fosfocolina
G	fase gas
h	hora
HCl	ácido clorhídrico
HDL	lipoproteína de alta densidad (high density lipoprotein)
$H_n$	hidrofobicidad por residuo de aminoácido

HNO <sub>3</sub>	ácido nítrico
Hz	Hertz
IDL	lipoproteína de densidad intermedia
kcal	kilocalorías
Kda	kilodaltones
KCl	cloruro de Potasio
L	fase líquido expandido
l	longitud de paso de luz
LB	Langmuir Blodgett
LC	fase líquido condensado
LCAT	lecitincolesterol aciltransferasa
m	metro
M	molar
$\mu\Omega$	micro-Ohm
MAB	microscopio de ángulo de Brewster
MFA	microscopio de fuerza atómica
mg	miligramos
min	minuto
ml	mililitros
mM	milimoles
mN	milinewton
MRC	concentración media por residuo
N	número de Avogadro
Ni	número de segmentos de una $\alpha$ -hélice
nm	nanometro
N <sub>mono</sub>	número de moléculas de proteína que penetran a la monocapa
NMR	nesonancia magnética nuclear
N <sub>sub</sub>	número de proteínas en la subfase
N <sub>T</sub>	suma de proteínas en la subfase
OTE	octadeciltriétoxosilano
PHD	método de predicción de Heidelberg
PLTP	proteína transferidora de fosfolípidos

SDS	dodecilsulfato de sodio
SFA	análisis de fuerzas de superficie (surface force analysis)
SR-B1	receptor pepenador (scavenger receptor class B type 1)
UV	luz ultravioleta
LDL	lipoproteína de baja densidad (low density lipoprotein)
VLDL	lipoproteína de muy baja densidad (very low density lipoprotein)
$V_{sub}$	volumen de la subfase
W	watts

## **RESUMEN**

Estudiar a las apolipoproteínas intercambiables (CI, AII, CIII, E3 y AI) en sistemas de monocapas de Langmuir ha resultado ser de importancia en el entendimiento de la relación entre la estructura y la función de estas proteínas anfipáticas. El análisis de predicción y experimentos de dicroísmo circular con estas apolipoproteínas, muestran altos contenidos de estructura hélice  $\alpha$  anfipática. En presencia de una fuerza iónica elevada conservan su carácter anfipático y mantienen el contenido de estructura secundaria hélice  $\alpha$ . El carácter anfipático que guardan las diferentes apolipoproteínas permiten que puedan orientarse sobre una interfase aire/agua de una subfase concentrada de KCl para formar monocapas de Langmuir. En una interfase lípido/agua, las apolipoproteínas difunden y penetran la monocapa del DPPC para formar monocapas de Langmuir binarias. Durante la compresión lateral de estas monocapas se observan cambios de organización conocidas como transiciones de fase, las cuales se pueden observar directamente con microscopía de ángulo de Brewster y microscopía de fuerza atómica. Las monocapas de Langmuir formadas con las apolipoproteínas (CI y AII) en una subfase altamente iónica y en presencia de fosfolípidos muestran cambios estructurales a altas presiones laterales. Estos cambios de conformación pudieran guardar una relación importante con cambios de tensión superficial de partículas HDL al madurar de una forma discoidal a una forma esférica. Más aún, estas diferencias en tensión superficial de las HDL en relación directa con los diferentes estados estructurales de las apolipoproteínas, a su vez también pudieran estar involucrados en el mecanismo de reconocimiento y transferencia de lípidos así como de reconocimiento de estas partículas a sus receptores en la membrana celular.

## ***INTRODUCCIÓN***

### ***Características de las apolipoproteínas intercambiables humanas***

Los lípidos como moléculas insolubles en agua se transportan en el plasma en forma de complejos macromoleculares llamados lipoproteínas. Estas partículas lipoproteicas contienen un núcleo no polar, que está constituido principalmente por triacilglicérol y ésteres de colesterol en concentraciones variables dependiendo de la lipoproteína que se trate. Alrededor de este núcleo existe una monocapa superficial de lípidos anfipáticos, que estabilizan a la partícula lipoproteica. De las diferentes combinaciones de lípidos y proteínas se producen partículas de lipoproteínas de diferentes densidades y tamaños, de las cuales se han descrito principalmente 6 clases: quilomicrones, remanentes de quilomicrones, lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), lipoproteína de densidad intermedia (IDL), lipoproteína de baja densidad (LDL) y lipoproteína de alta densidad (HDL).

Cada lipoproteína contiene también proteínas específicas localizadas en su superficie denominadas apoproteínas o apolipoproteínas. La función de las apolipoproteínas como proteínas afines a lípidos, es la de mantener la integridad estructural y controlar la direccionalidad de las partículas lipoproteicas en plasma. Estas se encuentran asociadas en dos grupos: a) apolipoproteínas no intercambiables que se encuentran fijadas a un tipo en particular de lipoproteína e incluyen a la apo B48 y apo B100, y b) apolipoproteínas intercambiables, denominadas así porque pueden unirse a más de un tipo de partículas lipoproteicas. Miembros de este último grupo son las apolipoproteínas AI, AII, AIV, CI, CII, CIII y E. Estas apolipoproteínas intercambiables aparentemente le confieren a las lipoproteínas orientación y capacidad de interactuar con receptores en la superficie de las células. El receptor pepenador o por sus siglas en inglés "scavenger" clase B tipo I (SR-B1) y la proteína cassette unidora de ATP (ABCA-1) han sido propuestas como importantes receptores para las HDLs. En su conjunto, las apolipoproteínas interaccionan con enzimas como la lecitina colesterol acil transferasa (LCAT) (Sorci-Thomas y col., 1998); proteínas transferidoras de lípidos, como la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP) (Asztalos y col., 2004) y la proteína transferidora de fosfolípidos (PLTP) (Oram y col., 2003), las cuales en su conjunto contribuyen a la conformación de partículas HDL. Mientras que las interacciones de la apo AI con SR-B1 y ABCA-1 han sido minuciosamente estudiadas en los últimos años, el papel que juegan las apolipoproteínas AII, CI y E durante este

proceso de remodelado, permanece como una de las preguntas por resolver. Es importante mencionar que cada una de estas apolipoproteínas presentan altos porcentajes de hélice  $\alpha$  anfipáticas.

Desde hace tiempo se ha documentado, que la formación de hélice  $\alpha$  anfipáticas juega un papel importante y relevante para la actividad de proteínas que unen lípidos como la CETP y las apolipoproteínas intercambiables humanas (Bolaños-García y col., 1997). Estas hélice  $\alpha$  anfipáticas presentan arreglos característicos, donde los residuos de aminoácidos con propiedades hidrofóbicas e hidrofílicas se orientan asimétricamente en direcciones opuestas para formar dos regiones bien definidas. Se han descrito principalmente 7 tipos de hélice  $\alpha$  anfipáticas de acuerdo a sus propiedades estructurales y fisicoquímicas, las cuales han sido denominadas A, H, L, K, G\*, C y M (Segrest J. P., 1992 y Segrest J. P., 1990, Bolaños y col., 1997). Las clases L y H tienen propiedades similares, ya que ambas presentan un valor de momento hidrofóbico ( $\mu H$ ) mayor de 0.35 kcal/mol por residuo y en la fase polar la mayoría de los residuos de aminoácidos están cargados positivamente. La clase K se caracteriza por presentar un valor alto de  $\mu H$ , mientras que la fase polar y la interfase presentan un alto índice de residuos de aminoácidos cargados positivamente. La clase C presenta una falta de agrupamiento de residuos de aminoácidos cargados en la cara polar y un valor menor de  $\mu H$  comparado con las otras 6 clases. La clase M se caracteriza por tener una baja densidad de carga, siendo la única con carga neta negativa. Esta clase presenta un valor mínimo de  $\mu H$  comparado con la clase A y L. La clase G presenta un valor alto de  $\mu H$  y una hidrofobicidad muy baja en la cara no polar, así como una falta de agrupamiento de residuos de aminoácidos cargados en la cara polar. La clase A presenta un agrupamiento único de residuos de aminoácidos cargados positivamente en la interfase polar-apolar y de residuos de aminoácidos cargados negativamente en el centro de la cara polar (Jones y col., 1992). Estos arreglos proporcionan a la proteína un incremento en su estabilidad al asociarse a bicapas membranales (Tytler y col., 1993), presentando altos niveles de hidrofobicidad, una clara superficie activa y un alto valor de momento hidrofóbico (Weinberg 1994; Venkatachalapathi y col., 1993). Las hélice  $\alpha$  clase A que presentan valores altos de  $\mu H$  se denominan clase A2 y aquéllas donde es menor la clase A1. Así mismo, existen características ligeramente distintas en las hélice  $\alpha$  anfipáticas clase A encontradas en la apo AIV con un valor de  $\mu H$

intermedio entre las clases A1 y A2 denominada clase A4. Las hélice  $\alpha$  clase AII incluye a las apolipoproteínas AII, CI, CII y CIII, mientras que la apo AI y apo E contienen hélice  $\alpha$  clase AI (Sparrow y col., 1973; Jackson y col., 1974; Chen y col., 1979). La apo AIV pertenece a la clase A4. Recientemente en el laboratorio del Dr. Jaime Mas se ha propuesto una nueva clase de hélice  $\alpha$  anfipática denominada "M-like", encontrada en la región carboxilo terminal (454-476) de la CETP (Bolaños y col., 1997). La característica más importante de esta nueva clase es la existencia de tres residuos de aminoácidos con carga negativa y solamente uno con carga positiva, la cual hace que no corresponda a ninguna de las clases descritas por Segrest y col. (1990, 1992).

Existe una serie de proteínas con características anfipáticas que forman películas de Langmuir, las cuales han sido estudiadas intensivamente mediante técnicas experimentales como microscopía de fluorescencia polarizada, difracción de rayos X, microscopía de ángulo de Brewster (MAB) y microscopía de fuerza atómica (MFA) (Knobler 1990; Höning y Möbius 1991; Henon y Meunier 1991; Arakawa y col., 1992; Engel y Müller 2000). De las proteínas más estudiadas con estas técnicas encontramos a las siguientes: citocromo c (Tanaka y col., 1995; 1997 y 1998), acetilcolinesterasa (Dziri y col., 1997), estreptavidina (Frey y col., 1966), proteína surfactante humana SP-B (Lipp y col., 1997), proteína hemo tetra helicoidal  $\alpha$  ( $\alpha_{ss}\alpha$ ) (Chen y col., 1998) y recientemente el estudio de la apo CI llevado a cabo en colaboración por los laboratorios de los Doctores Jaime Mas-Oliva y Rolando Castillo.

Con base a esta información, a continuación se hace una breve descripción de las apolipoproteínas intercambiables humanas CI, AII, AI, CIII, y E considerando sus propiedades estructurales y funcionales.

### ***Apolipoproteína CI***

La apo CI es una proteína que contiene 57 residuos de aminoácidos y una masa molecular de 6.7 kDa, se encuentra distribuida principalmente en partículas VLDL y en menor proporción en HDL. Es una proteína activadora de la enzima LCAT (Soutar y col., 1975 y Jonas y col., 1984) y es la responsable de la formación de ésteres de colesterol (Glomset 1968). Inhibe a la fosfolipasa A<sub>2</sub> (Poensgen 1990), a la lipasa hepática (Kinnunen y Ehnolm 1976) y estimula el crecimiento celular (Tournier y col., 1984). También participa en la modulación que ejerce la apolipoproteína E durante su



interacción con partículas  $\beta$ -VLDL (Weisgraber y col., 1990; Swaney y Weisgraber 1994) y en la inhibición del metabolismo celular dependiente de apo E de partículas VLDL a través de receptores LDL (Sehayek y Eisenberg 1991). Estudios *in vitro* indican, que la apo C puede ser transferida como un complejo conteniendo a las apos C2, C3, fosfolípidos y colesterol (Windler y Havel 1985).

Se han obtenido 2 formas cristalinas de la apo C1 a temperatura ambiente utilizando mezclas de 2-metil-2,4-pentanediol, acetato de sodio y octil- $\beta$ -1-tioglucopiranosido. Las estructuras de los cristales han sido resueltas mediante análisis de difracción de rayos X a una resolución menor que 3.0 Å (Weisgraber y col., 1994). Estudios con NMR de la apo C1 nativa y de péptidos sintéticos marcados con  $^{15}\text{N}$  en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS), muestran una proteína con dos regiones hélice  $\alpha$  (Val-4-Lys-30 y Leu-34-Met-38) unidas por una región de estructura irregular (Gln-31-Glu-33). Aparentemente, el segmento amino terminal de la hélice  $\alpha$  Val-4-Gly-15 y el segmento Leu-34-Met-38 presentan mayor flexibilidad que los segmentos Asn-16-Lys-30 y Arg-39 a Lys-52. También se han realizados estudios con los siguientes péptidos: 1-38 (TPDVSSALDKLKEFGNTLEDKAR ELISRIKQSELSAKM), 7-24 (ALDKLK EFGNTLEDKARE) y 35-53 (SAKMREWFSET FQKVKEKL), los cuales presentan segmentos hélice  $\alpha$  de tipo anfipático (Rozek y col., 1995; 1997; Buchko y col., 1995).

### ***Apolipoproteína AII***

La apo AII humana es la segunda proteína más abundante de las partículas HDL, ya que cerca del 25 % de la masa de la lipoproteína corresponde a esta proteína (Atkinson y Small 1986). La apo AII se sintetiza principalmente en el hígado y en menor porcentaje en el intestino delgado (Schonfeld y col 1982; Hussain y Zannis 1990; López y col., 1994). Análisis estructurales muestran a una proteína dimérica, constituida por dos cadenas polipeptídicas idénticas de 77 residuos de aminoácidos y unidas por un puente disulfuro en la posición 6 (Brewer y col., 1972). La proteína presenta una masa molecular de 17.4 kDa y un punto isoeléctrico de 4.9. La apolipoproteína AII presenta varias actividades; participa en la regulación del metabolismo de las partículas HDL, regula la lipasa hepática, desplaza a la apo AI de la superficie de las partículas HDL (Lagocki y Scanu 1980) y compite por los sitios de unión de las HDL en la superficie celular (Fidge y Nestel 1985). El desplazamiento de la apo AI puede dañar la capacidad

de transporte reverso del colesterol y por lo tanto aumentar el riesgo de desarrollar enfermedades isquémicas cardíacas (López y col., 1994).

Recientemente, la estructura de la apo AII ha sido reportada en ausencia de lípidos y en presencia de un sustituto de lípidos como lo es el  $\beta$ -Octil glucósido (Kumar y col., 2002). Las estructuras revelan que la apo AII forma dímeros unidos por un puente disulfuro y se ha observado que se organizan para formar tetrámeros. Estas estructuras han sido resueltas y refinadas a una resolución de 2.0 Å en ausencia de lípidos y a 2.3 Å en presencia de  $\beta$ -Octil glucósido (Kumar y col., 2002).

### ***Apolipoproteína AI***

La apo AI es el mayor componente de las partículas HDL (70 %), define el tamaño, la forma y determina la estructura-función de estas lipoproteínas (Phillips y col., 1997). Es la responsable de unir y transportar lípidos, de activar a la enzima LCAT (Rothblat y col., 1992), de estimular el flujo de colesterol desde los tejidos periféricos (Glomset 1968; Fielding y Fielding 1995) y funciona como ligando a receptores de superficie celular (Fielding y Fielding 2001). Sin embargo, los mecanismos por los cuales estos procesos son llevados a cabo aún son desconocidos. La apo AI presenta una masa molecular de 28.3 kDa y está constituida por 243 residuos de aminoácidos. El dominio amino terminal comprende los primeros 43 residuos de aminoácido codificado por el exon 3 del gen de la apo AI y los otros 200 residuos de aminoácidos, constituyen al dominio carboxilo terminal codificado por el exon 4 del gen de la apo AI (Kostner y Alaupovic 1971; Luo y col., 1986). A lo largo de su secuencia primaria se ha encontrado un patrón reiterado de arreglos de residuos de aminoácido en tándem de 11 y 22 residuos de extensión que forman hélice  $\alpha$  anfipáticas, que unen fosfolípidos y estabilizan a las partículas HDL (Segrest y col., 1992).

Cuando la apo AI se asocia a lípidos se observa un incremento en los porcentajes de estructura hélice  $\alpha$  de aproximadamente un 70-80 %, mientras que en ausencia de lípidos, baja fuerza iónica y a pH fisiológico presenta únicamente un 50 % de estructura hélice  $\alpha$  (Jonas y col., 1990). Se ha observado que péptidos de apo AI presentan un incremento del 50% en su estructura secundaria hélice  $\alpha$  cuando se asocian a complejos micelares de dimiristoil fosfatidil colina (DMPC) (Mishra y col., 1998). Se ha considerado que la apo AI en presencia de fosfolípidos favorece una

mayor estabilidad de su estructura secundaria, la cual puede ser muy importante para el proceso de reconocimiento y transferencia de lípidos. Las hélice  $\alpha$  anfipáticas juegan un papel importante en la regulación metabólica de las lipoproteínas, de igual forma, cuando estas proteínas se asocian a fosfolípidos presentan una mayor cooperatividad (Gursky y Atkinson 1996; Fang y col., 2003a; 2003b).

De manera interesante, un fragmento truncado de la apo AI (residuos de aminoácidos 44-243) ha sido cristalizado y mediante difracción de rayos X se ha determinado su estructura a una resolución de 4 Å, revelando la presencia de cuatro moléculas y organizándose en forma antiparalela (Borhani y col., 1997; Okon y col., 2001). En presencia de micelas se identificaron a 11 hélice  $\alpha$  y en ausencia de lípidos a 10 hélice  $\alpha$  anfipáticas (Borhani y col., 1997; Okon y col., 2002). Se ha observado que las regiones hélice  $\alpha$  7 y 8 son esenciales para la unión a lípidos e importantes para que la proteína pueda asociarse con diferentes subclases de partículas HDL (Reschly y col., 2002). Mediante análisis con NMR, la apo AI en presencia de SDS presenta los siguientes segmentos helicoidales: 8-32, 45-64, 67-77, 82-86, 90-97, 100-118, 122-140, 146-162, 167-205, 210-216, y 221-239 (Okon y col., 2001).

### ***Apolipoproteína CIII***

La apo CIII es una glicoproteína de 79 residuos de aminoácidos con una masa molecular de 8.8 kDa, se sintetiza principalmente en el hígado y en menor porcentaje en el intestino delgado (Herbert y col., 1983). La apo CIII se encuentra asociada principalmente a las partículas de los quilomicrones, VLDL y HDL (Gotto y col., 1986). Existe una fuerte correlación positiva entre los niveles de la apo CIII en plasma con los niveles de triacilgliceroles y el retiro de lipoproteínas posprandiales (Shoulders y col., 1991; Castelli 1992; Bainton y col., 1992; Koren y col., 1996). Sin embargo, la función de esta proteína aún no ha sido dilucidada, aunque ha sido postulada como un modulador en el fenómeno de internalización de lipoproteínas mediada por receptor (Quarfordt y col., 1982; Windler y Havel 1985). También se ha propuesto su participación en la modulación de la hidrólisis de los triacilgliceroles por la acción de la lipasa hepática (Wang y col., 1985; Luo y col., 1986; Ito y col., 1990).

## ***Apolipoproteína E***

La apo E es una glicoproteína que contiene 299 residuos de aminoácidos y una masa molecular de 34.2 kDa. Esta proteína se encuentra asociada principalmente con los quilomicrones, partículas VLDL, IDL y con diferentes subclases de HDL (Shore y Shore 1973; Mahley y col., 1984; Mahley 1988; Weisgraber 1994). Participa en el metabolismo de lípidos, en la enfermedad de Alzheimer y en el reconocimiento a nivel de tejido neuronal (Weisgraber y col., 1994). Actualmente se han identificado las isoformas E2, E3, E4, (Utermann y col., 1980), las cuales son codificadas por los alelos  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  y  $\epsilon 4$  comunes en un solo locus genético (Zannis y col., 1981; Zannis y Breslow 1981). De las tres isoformas la más común es la apo E3, la cual es considerada la isoforma normal y que presenta un residuo de cisteína en la posición 112 y una arginina en la posición 158 (Rall y col., 1982<sup>b</sup>; Raussens y col., 2000). La digestión de la apo E3 con trombina produce dos dominios funcionales (Aggerbeck y col., 1988<sup>a,b</sup>; Wetterau y col., 1988); el dominio del amino terminal que comprende los residuos de aminoácidos 1-191 con una masa molecular 22 kDa y el dominio carboxilo terminal de 10 kDa que comprende los residuos de aminoácidos 216-299. En el dominio amino terminal de 22 kDa, se localiza al receptor de unión a LDL entre los residuos de aminoácidos 130 y 150 (Mahley 1988; Weisgraber 1994). Otros estudios han considerado que el dominio amino terminal se asocia muy poco con las lipoproteínas plasmáticas (Weisgraber 1990; Westerlund y Weisgraber 1993), sugiriendo que la afinidad a lípidos es muy débil. El dominio carboxilo terminal es rico en aminoácidos básicos y es soluble en agua, esto favorece que adopte una conformación monomérica siendo resistente a la desnaturalización (Raussens y col., 2000).

La isoforma apo E4 se asocia con niveles elevados de colesterol total y colesterol asociado a LDL, como consecuencia induce el desarrollo de hipercolesterolemia y aterosclerosis (Utermann y col., 1984, Eichner y col., 1993; Luc y col., 1994). De igual forma, es un factor de riesgo importante para el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (Corder y col., 1993; Saunders y col., 1993; Strittmatter y col., 1993) y otras formas de neurodegeneración (Mayeux y col., 1995; Slioter y col., 1997; Teasdale y col., 1997).

## Referencias

- 1) Aggerbeck LP, Wetterau JR, Weisgraber KH, Mahley RW, Agard DA. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies on the amino-terminal (receptor-binding) domain of human apolipoprotein E3 from serum very low density lipoproteins. *J Mol Biol.* 1988a. **202**: 179-181.
- 2) Aggerbeck LP, Wetterau JR, Weisgraber KH, Wu CS, Lindgren FT. Human apolipoprotein E3 in aqueous solution. II. Properties of the amino- and carboxyl-terminal domains. *J Biol Chem.* 1988b. **263**: 6249-6258.
- 3) Arakawa H, Umemura K, Ikai A: Protein images obtained by STM, AFM and TEM. *Nature.* 1992. **358**: 171-173.
- 4) Asztalos BF, Horvath KV, Kajinami K, Nartsupha C, Cox CE, Batista M, Schaefer EJ, Inazu A, Mabuchi H. Apolipoprotein composition of HDL in cholesteryl ester transfer protein deficiency. *J Lipid Res.* 2004. **45**: 448-455.
- 5) Atkinson D, Small DM. Recombinant lipoproteins: implications for structure and assembly of native lipoproteins. *Annu Rev Biophys Blophys Chem.* 1986. **15**: 403-456.
- 6) Bainton D, Miller NE, Bolton CH, Yarnell JW, Sweetnam PM, Baker IA, Lewis B, Elwood PC. Plasma triglyceride and high density lipoprotein cholesterol as predictors of ischaemic heart disease in British men. The Caerphilly and Speedwell Collaborative Heart Disease Studies. *Br Heart J.* 1992. **68**: 60-66.
- 7) Bolaños-García VM, Mas-Oliva, J, Ramos, S, Castillo R. Phase Transitions in Monolayers of Human Apolipoprotein C-I. *J Phys Chem B.* 1999. **103**: 6236-6242.
- 8) Bolaños-García VM, Soriano-García M, Mas-Oliva J. CETP and exchangeable apoproteins: common features in lipid binding activity. *Mol Cell Biochem.* 1997. **175**: 1-10.
- 9) Borhani DW, Rogers DP, Engler JA, Brouillette CG. Crystal structure of truncated human apolipoprotein A-I suggests a lipid-bound conformation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997. **94**: 12291-12296.
- 10) Brewer HB Jr, Lux SE, Ronan R, John KM. Amino acid sequence of human apoLp-Gln-II (apoA-II), an apolipoprotein isolated from the high-density lipoprotein complex. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1972. **69**: 1304-1308.

- 11) Buchko GW, Rozek A, Zhong Q, Cushley RJ. Sequence-specific <sup>1</sup>H NMR assignments and secondary structure of a lipid-associating peptide from human ApoC-I: an NMR study of an amphipathic helix motif. *Pept Res*. 1995. **8**: 86-94.
- 12) Castelli WP. Epidemiology of triglycerides: a view from Framingham. *Am J Cardiol*. 1992. **70**: 3H-9H.
- 13) Chen TC, Sparrow JT, Gotto AM Jr, Morrisett JD. Apolipoprotein A-II: chemical synthesis and biophysical properties of three peptides corresponding to fragments in the amino-terminal half. *Biochemistry*. 1979. **18**: 1617-1622.
- 14) Chen X, Moser CC, Pilloud DL, Dutton PL. Molecular Orientation of Langmuir-Blodgett Films of Designed Heme Protein and Lipoprotein Maquettes. *J Phys Chem B*. 1998. **102**: 6425-6432.
- 15) Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*. 1993. **261**: 921-923.
- 16) Dziri L, Boussaad S, Wang S, Leblanc RM. Surface Topography of Acetylcholinesterase in Langmuir and Langmuir-Blodgett Films. *J Phys Chem B*. 1997. **101**: 6741-6748.
- 17) Eichner JE, Kuller LH, Orchard TJ, Grandits GA, McCallum LM, Ferrell RE, Neaton JD. Relation of apolipoprotein E phenotype to myocardial infarction and mortality from coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 1993. **71**: 160-165.
- 18) Engel A, Muller DJ. Observing single biomolecules at work with the atomic force microscope. *Nat Struct Biol*. 2000. **7**: 715-718.
- 19) Fang Y, Gursky O, Atkinson D. Lipid-binding studies of human apolipoprotein A-I and its terminally truncated mutants. *Biochemistry*. 2003. **42**:13260-13268.
- 20) Fang Y, Gursky O, Atkinson D. Structural studies of N- and C-terminally truncated human apolipoprotein A-I. *Biochemistry*. 2003. **42**: 6881-6890.
- 21) Fidge NH, and Nestel PJ: Identification of apolipoproteins involved in the interaction of human high density lipoprotein3 with receptors on cultured cells. *J Biol Chem*. 1985. **260**: 3570-3575.
- 22) Fielding CJ, Fielding PE. Cellular cholesterol efflux. *Biochim Biophys Acta*. 2001. **1533**: 175-189.

- 23) Fielding CJ, Fielding PE. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res*. 1995. **36**: 211-228.
- 24) Frey W, Schief WR Jr, Vogel V. Two-Dimensional Crystallization of Streptavidin Studied by Quantitative Brewster Angle Microscopy. *Langmuir*. 1996. **12**: 1312-1320.
- 25) Glomset JA. The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction. *J Lipid Res*. 1968. **9**: 155-167.
- 26) Gotto AM Jr, Pownall, Havel RJ. Introduction to the plasma lipoproteins. *Methods Enzymol*. 1986. **128**: 3-41.
- 27) Gursky O, Atkinson D. Thermal unfolding of human high-density apolipoprotein A-1: implications for a lipid-free molten globular state. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996. **93**: 2991-2995.
- 28) Henon S, Meunier J. Microscope at the Brewster angle: Direct observation of first-order phase transitions in monolayers. *Rev Sci Instrum*. 1991. **62**: 936-939.
- 29) Herbert PN, Assmann G, Gotto AM Jr, Frederickson DS. Disorders of the lipoprotein and lipid metabolism. *In The Metabolic Basis of Inherited Diseases*. 5th edition. Stanbury JB, Wyngaarden JB, Frederickson DS, Goldstein JL, and Brown, editors. McGraw-Hill, New York. 1983. 589-651.
- 30) Höning D, Möbius D. Direct visualization of monolayers at the air-water interface by Brewster angle microscopy. *J Phys Chem*. 1991. **95**: 4590-4592.
- 31) Hussain MM, Zannis VI. Intracellular modification of human apolipoprotein AII (apoAII) and sites of apoAII mRNA synthesis: comparison of apoAII with apoCII and apoCIII isoproteins. *Biochemistry*. 1990. **29**: 209-217.
- 32) Ito Y, Azrolan N, O'Connell A, Walsh A, Breslow JL. Hypertriglyceridemia as a result of human apo CIII gene expression in transgenic mice. *Science*. 1990. **249**: 790-793.
- 33) Jackson RL, Morrisett JD, Sparrow JT, Segrest JP, Pownall HJ, Smith LC, Hoff HF, Gotto AM Jr. The interaction of apolipoprotein-serine with phosphatidylcholine. *J Biol Chem*. 1974. **249**: 5314-5320.
- 34) Jonas A, Sweeny SA, Herbert PN. Discoidal complexes of A and C apolipoproteins with lipids and their reactions with lecithin: cholesterol acyltransferase. *J Biol Chem*. 1984. **259**: 6369-6375.

- 35) Jonas A, Wald JH, Toohill KL, Krul ES, Kezdy KE. Apolipoprotein A-I structure and lipid properties in homogeneous, reconstituted spherical and discoidal high density lipoproteins. *J Biol Chem*. 1990. **25**: 22123-22129.
- 36) Jones MK, Anantharamaiah GM, Segrest JP. Computer programs to identify and classify amphipathic alpha helical domains. *J Lipid Res*. 1992. **33**: 287-296.
- 37) Kinnunen PK, Ehnolm C. Effect of serum and C-apoproteins from very low density lipoproteins on human postheparin plasma hepatic lipase. *FEBS Lett*. 1976. **65**: 354-357.
- 38) Knobler C. M. *In advances In Chemical Physics, LXXVII*. Eds Prigogine I, Rice SA., (Interscience, New York, 1990) Vol. **77**. pp. 397-449.
- 39) Koren E, Corder C, Mueller G, Centurion H, Hallum G, Fesmire J, McConathy WD, Alaupovic P. Triglyceride enriched lipoprotein particles correlate with the severity of coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 1996. **122**:105-115.
- 40) Kostner G, Alaupovic P. Studies of the composition and structure of plasma lipoproteins. C- and N-terminal amino acids of the two nonidentical polypeptides of human plasma apolipoprotein A. *FEBS Lett*. 1971. **15**: 320-324.
- 41) Kumar MS, Carson M, Hussain MM, Murthy HM. Structures of apolipoprotein A-II and a lipid-surrogate complex provide insights into apolipoprotein-lipid interactions. *Biochemistry*. 2002. **41**: 11681-11691.
- 42) Lagocki PA, Scanu AM. In vitro modulation of the apolipoprotein composition of high density lipoprotein. Displacement of apolipoprotein A-I from high density lipoprotein by apolipoprotein A-II. *J Biol Chem*. 1980. **255**: 3701-3706.
- 43) Lipp MM., Lee KY, Waring A, Zasadzinski JA. Fluorescence, polarized fluorescence, and Brewster angle microscopy of palmitic acid and lung surfactant protein B monolayers. *Biophys J*. 1997. **72**: 2783-2804.
- 44) Lopez J, Latta M, Collet X, Vanloo B, Jung G, Deneffe P, Rosseneu M, Chambaz J: Purification and characterization of recombinant human apolipoprotein A-II expressed in Escherichia coli. *Eur J Biochem*. 1994. **225**: 1141-1150.
- 45) Luc G, Bard JM, Arveiler D, Evans A, Cambou JP, Bingham A, Amouyel P, Schaffer P, Ruidavets JB, Cambien F, Fruchart JC, Ducimetiere P. Impact of apolipoprotein E polymorphism on lipoproteins and risk of myocardial infarction. The ECTIM study. *Arterioscler Thromb*. 1994. **14**: 1412-1419.



- 46) Luo CC, Li WH, Moore MN, Chan L. Structure and evolution of the apolipoprotein multigene family. *J Mol Biol*. 1986. **187**: 325-340.
- 47) Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC Jr, Weisgraber KH. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res*. 1984. **25**: 1277-1294.
- 48) Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*. 1988. **240**: 622-630.
- 49) Mayeux R, Toman R, Maestre G, Ngai C, Tang M-X, Ginseberg H, Chun M, Tycko B, Shelanski M. Synergistic effects of traumatic head injury and apolipoprotein- $\epsilon$ 4 in patients with Alzheimer's disease. *Neurology*. 1995. **45**: 555-557.
- 50) Mishra VK, Palgunachari MN, Datta G, Phillips MC, Lund-Katz S, Adeyeye SO, Segrest JP, Anantharamaiah GM. Studies of synthetic peptides of human apolipoprotein A-I containing tandem amphipathic alpha-helices. *Biochemistry*. 1998. **37**: 10313-10324.
- 51) Okon M, Frank PG, Marcel YL, Cushley RJ. Heteronuclear NMR studies of human serum apolipoprotein A-I. Part I. Secondary structure in lipid-mimetic solution. *FEBS Lett*. 2002. **517**: 139-143.
- 52) Okon M, Frank PG, Marcel YL, Cushley RJ. Secondary structure of human apolipoprotein A-I(1-186) in lipid-mimetic solution. *FEBS Lett*. 2001. **487**: 390-396.
- 53) Oram JF, Wolfbauer G, Vaughan AM, Tang C, Albers JJ. Phospholipid transfer protein interacts with and stabilizes ATP-binding cassette transporter A1 and enhances cholesterol efflux from cells. *J Biol Chem*. 2003. **278**: 52379-52385.
- 54) Phillips JC, Wriggers W, Li Z, Jonas A, Schulten K. Predicting the structure of apolipoprotein A-I in reconstituted high-density lipoprotein disks. *Biophys J*. 1997. **73**: 2337-46.
- 55) Poensgen J. Apolipoprotein C-1 inhibits the hydrolysis by phospholipase A2 of phospholipids in liposomes and cell membranes. *Biochim Biophys Acta*. 1990. **1042**: 188-192.
- 56) Quarfordt SH, Michalopoulos G, Schirmer B. The effect of human C apolipoproteins on the in vitro hepatic metabolism of triglyceride emulsions in the rat. *J Biol Chem*. 1982. **257**: 14642-14647.

- 57) Rall SC Jr, Weisgraber KH, Mahley RW. Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence. *J Biol Chem*. 1982b. **257**: 4171-4178.
- 58) Raussens V, Mah MK, Kay CM, Sykes BD, Ryan RO. Structural characterization of a low density lipoprotein receptor-active apolipoprotein E peptide, ApoE3- (126-183). *J Biol Chem*. 2000. **275**: 38329-38336.
- 59) Reschly EJ, Sorci-Thomas MG, Davidson WS, Meredith SC, Reardon CA, Getz GS. Apolipoprotein A-I alpha-helices 7 and 8 modulate high density lipoprotein subclass distribution. *J Biol Chem*. 2002. **277**: 9645-9654.
- 60) Rothblat GH, Mahlberg FH, Johnson WJ, Phillips MC. Apolipoproteins, membrane cholesterol domains, and the regulation of cholesterol efflux. *J Lipid Res*. 33. 1992. **33**: 1091-1097.
- 61) Rozek A, Buchko GW, Cushley RJ. Conformation of two peptides corresponding to human apolipoprotein C-I residues 7-24 and 35-53 in the presence of sodium dodecyl sulfate by CD and NMR spectroscopy. *Biochemistry*. 1995. **34**: 7401-7408.
- 62) Rozek A, Buchko GW, Kanda P, Cushley RJ. Conformational studies of the N-terminal lipid-associating domain of human apolipoprotein C-I by CD and <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Protein Sci*. 1997. **6**:1858-1868.
- 63) Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH St, Pericak-Vance MA, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Crapper-MacLachlan DR, Alberts MJ, Hulette C, Crain B, Goldgaber D, Roses AD. Association of apolipoprotein E allele  $\epsilon$ 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology*. 1993. **43**: 1467-1472.
- 64) Schonfeld G, Patsch W, Rudel LL, Nelson C, Epstein M, Olson RE. Effects of dietary cholesterol and fatty acids on plasma lipoproteins. *J Clin Invest*. 1982. **69**: 1072-1080.
- 65) Segrest JP, De Loof H, Dohlman JG, Brouillette CG, Anantharamaiah GM. Amphipathic helix motif: classes and properties. *Proteins*. 1990. **8**: 103-117.
- 66) Segrest JP, Jones MK, De Loof H, Brouillette CG, Venkatachalapathi YV, Anantharamaiah GM. The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function. *J Lipid Res*. 1992. **33**: 141-166.

- 67) Sehayek E, Eisenberg S. Mechanisms of inhibition by apolipoprotein C of apolipoprotein E-dependent cellular metabolism of human triglyceride-rich lipoproteins through the low density lipoprotein receptor pathway. *J Biol Chem*. 1991. **266**:18259-18267.
- 68) Shore VG, Shore B. Heterogeneity of human plasma very low density lipoproteins. Separation of species differing in protein components. *Biochemistry*. 1973. **12**: 502-507.
- 69) Shoulders CC, Harry PJ, Lagrost L, White SE, Shah NF, North JD, Gilligan M, Gambert P, Ball MJ. Variation at the apo AI/CIII/AIV gene complex is associated with elevated plasma levels of apo CIII. *Atherosclerosis*. 1991. **87**: 239-247.
- 70) Slooter AJC, Tang MX, van Duijn CM, Stern Y, Ott A, Bell K, Bretele MMB, Van Broeckhoven C, Tatemichi TK, Tycko B. Apolipoprotein E4 and the risk of dementia with stroke. A population-based investigation. *JAM Med Assoc*. 1997. **277**: 818-821.
- 71) Sorci-Thomas MG, Curtiss L, Parks JS, Thomas MJ, Kearns MW, Landrum M. The hydrophobic face orientation of apolipoprotein A-I amphipathic helix domain 143-164 regulates lecithin: cholesterol acyltransferase activation. *J Biol Chem*. 1998. **273**: 11776-11782.
- 72) Soutar AK, Garner CW, Baker HN, Sparrow JT, Jackson RL, Gotto AM, and Smith LC. Effect of the human plasma apolipoproteins and phosphatidylcholine acyl donor on the activity of lecithin: cholesterol acyltransferase. *Biochemistry*. 1975. **14**: 3057-3064.
- 73) Sparrow JT, Gotto AM Jr, Morrisett JD. Chemical synthesis and biochemical properties of peptide fragments of apolipoprotein-alanine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1973. **70**: 2124-2128.
- 74) Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD. Apolipoprotein E: High-avidity binding to  $\beta$ -amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993. **90**: 1977-1981.
- 75) Swaney JB, Weisgraber KH. Effect of apolipoprotein C-I peptides on the apolipoprotein E content and receptor-binding properties of beta-migrating very low density lipoproteins. *J Lipid Res*. 1994. **35**: 134-142.

- 76) Tanaka H, Akatsuka T, Murakami T, Ogoma Y, Abe K, Kondo Y. *In situ* observation of bovine serum albumin-adsorbed stearic acid monolayer by Brewster angle microscopy. ***J Biochem***. 1997. **121**: 206-211.
- 77) Tanaka H, Akatsuka T, Ohe T, Ogoma Y, Abe K, Kondo Y. *In situ* observation of protein-adsorbed stearic acid monolayer by Brewster angle microscopy and fluorescence microscopy. ***Polym Adv Technol***. 1998. **9**: 150-154
- 78) Tanaka H, Hayashi K, Akatsuka T, Toyama J, Noda K, Kida T, Ogoma Y, Fujii T, Kondo Y: Morphology of a cytochrome c-adsorbed stearic acid monolayer on Brewster angle microscopy. ***J Biochem***. 1995. **117**: 1151-1155.
- 79) Teasdale GM, Nicoll JAR, Murray G, Fiddes M. Association of apolipoprotein E polymorphism with outcome after head injury. ***Lancet***. 1997. **350**: 1069-1071.
- 80) Tournier JF, Bayard F, Tauber JP. Rapid purification and activity of apolipoprotein C1 on the proliferation of bovine vascular endothelial cells in vitro. ***Biochim Biophys Acta***. 1984. **804**: 216-220.
- 81) Tytler EM, Segrest JP, Epand RM, Nie SQ, Epand RF, Mishra VK, Venkatachalapathi YV, Anantharamaiah GM. Reciprocal effects of apolipoprotein and lytic peptide analogs on membranes. Cross-sectional molecular shapes of amphipathic alpha helices control membrane stability. ***J Biol Chem***. 1993. **268**: 22112-22118.
- 82) Utermann G, Hardewig A, Zimmer F. Apolipoprotein E phenotypes in patients with myocardial infarction. ***Hum Genet***. 1984. **65**: 237-241.
- 83) Utermann G, Langenbeck U, Beisiegel U, Weber W. Genetics of the apolipoprotein E system in man. ***Am J Hum Genet***. 1980. **32**: 339-347.
- 84) Venkatachalapathi YV, Phillips MC, Epand RM, Epand RF, Tytler EM, Segrest JP, Anantharamaiah GM. Effect of end group blockage on the properties of a class A amphipathic helical peptide. ***Proteins***. 1993. **15**: 349-359.
- 85) Wang CS, McConathy WJ, Kloer HU, Alaupovic P. Modulation of lipoprotein lipase activity by apolipoproteins. Effect of apolipoprotein C-III. ***J Clin Invest***. 1985. **75**: 384-390.
- 86) Weinberg RB. Identification of functional domains in the plasma apolipoproteins by analysis of inter-species sequence variability. ***J Lipid Res***. 1994. **35**: 2212-2222.

- 87) Weisgraber KH, Mahley RW, Kowal RC, Herz J, Goldstein JL, Brown MS. Apolipoprotein C-I modulates the interaction of apolipoprotein E with beta-migrating very low density lipoproteins (beta-VLDL) and inhibits binding of beta-VLDL to low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem*. 1990. **265**: 22453-22459.
- 88) Weisgraber KH, Newhouse YM, McPherson A. Crystallization and preliminary X-ray analysis of human plasma apolipoprotein C-I. *J Mol Biol*. 1994. **236**: 382-384.
- 89) Weisgraber KH. Apolipoprotein E distribution among human plasma lipoproteins: role of the cysteine-arginine interchange at residue 112. *J Lipid Res*. 1990. **31**: 1503-1511.
- 90) Weisgraber KH. Apolipoprotein E: structure-function relationships. *Adv. Protein Chem*. 1994. **45**: 249-302.
- 91) Westerlund JA, Weisgraber KH. Discrete carboxyl-terminal segments of apolipoprotein E mediate lipoprotein association and protein oligomerization. *J Biol Chem*. 1993. **268**: 15745-15750.
- 92) Wetterau JR, Aggerbeck LP, Rall SC Jr, Weisgraber KH. Human apolipoprotein E3 in aqueous solution. I. Evidence for two structural domains. *J Biol Chem*. 1988. **263**: 6240-6248.
- 93) Windler E, Havel RJ. Inhibitory effects of C apolipoproteins from rats and humans on the uptake of triglyceride-rich lipoproteins and their remnants by the perfused rat liver. *J Lipid Res*. 1985. **26**: 556-565.
- 94) Windler E, Havel RJ. Inhibitory effects of C apolipoproteins from rats and humans on the uptake of triglyceride-rich lipoproteins and their remnants by the perfused rat liver. *J Lipid Res*. 1985. **26**: 556-565.
- 95) Zannis VI, Breslow JL. Human very low density lipoprotein apolipoprotein E isoprotein polymorphism is explained by genetic variation and posttranslational modification. *Biochemistry*. 1981. **20**: 1033-1041.
- 96) Zannis VI, Just PW, Breslow JL. Human apolipoprotein E isoprotein subclasses are genetically determined. *Am J Hum Genet*. 1981. **33**: 11-24.

### ***HIPÓTESIS***

Con fundamento en las propiedades fisicoquímicas de cada una de las apolipoproteínas intercambiables estudiadas, consideramos que un cambio básico de estructura secundaria pudiera fundamentar sus propiedades de unión a lípidos, capacidad de transferencia y unión a receptores así como de intercambio entre partículas lipoproteicas.

## **OBJETIVOS**

- 1) De manera teórica se definieron los porcentajes de estructura hélice  $\alpha$  con base en las secuencias primarias de las diferentes apolipoproteínas intercambiables, utilizando el método de predicción de estructura secundaria PHD HeiDelberg.
- 2) Los porcentajes de estructura alfa-beta de cada una de las apolipoproteínas intercambiables se definieron en forma experimental, llevando a cabo estudios de dicroísmo circular a diferentes temperaturas y concentración de sal (KCl).
- 3) Mediante microscopía de ángulo de Brewster (MAB) se observaron los comportamientos de las monocapas de apolipoproteínas intercambiables, al ser sometidas a presiones laterales.
- 4) Las monocapas de apolipoproteínas CI y AII se transfirieron tanto en mica hidrofílica como en mica hidrofóbica cubierta con octadeciltriétoxisilano (OTE), a diferentes presiones laterales con el fin de formar películas de Langmuir-Blodgett (LB).
- 5) Mediante microscopía de fuerza atómica (MFA) se analizaron los comportamientos topográficos de las películas de LB de las apolipoproteínas CI y AII.
- 6) Mediante MAB se observaron las diferentes transiciones de fase, de las apolipoproteínas intercambiables contenidas en monocapas de dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC) al ser sometidas a presiones laterales.
- 7) Integración en un contexto fisiológico de nuestros hallazgos experimentales.

## ***MATERIAL Y MÉTODOS***



### **Predicción de estructura secundaria**

Para determinar de manera teórica los porcentajes de estructura secundaria de las apolipoproteínas AII, AI, CIII y E3 empleamos el método de predicción PHD Heidelberg (PHD versión 5.94-317). Es importante mencionar que únicamente se realizó el análisis de predicción de estructura secundaria de la región carboxilo terminal de la apo E3, debido a que la estructura tridimensional de la región amino terminal 1-191 ha sido resuelta cristalográficamente (Wilson y col., 1991).

### **Cálculo del momento hidrofóbico**

Para calcular los valores de  $\mu H$  de las regiones hélice  $\alpha$  de las apolipoproteínas AI, AII, CIII y E3 empleamos la ecuación 1. La expresión analítica de esta ecuación forma parte del programa PCGene (IntelliGenetics Inc., 1991), la cual se basa en el principio propuesto por Eisenberg y colaboradores (1982; 1984).

$$\mu H = \sqrt{\left[\sum_{n=1}^N H_n \text{sen}(\delta n)\right]^2 + \left[\sum_{n=1}^N H_n \text{cos}(\delta n)\right]^2} \quad (1)$$

Donde el símbolo  $H_n$  corresponde a la hidrofobicidad del  $n$ -simo residuo de aminoácido expresado (kcal/mol) y  $\delta$  corresponde al ángulo formado (expresado en radianes) entre dos residuos de aminoácidos involucrados en una estructura helicoidal. Para una hélice  $\alpha$ , el valor típico de  $\delta$  es de 100 grados de arco y cada 3.6 residuos de aminoácidos conforma una vuelta completa de una hélice  $\alpha$ :

$$1 \text{ vuelta de hélice} = 3.6 \text{ residuos} * 100 \text{ grados de arco} = 360 \text{ grados de arco.}$$

El objetivo de calcular el  $\mu H$  es obtener un análisis cuantitativo del grado de anfifilicidad de ciertos segmentos helicoidales de una proteína, donde el  $\mu H$  ha sido propuesto como un parámetro importante para obtener una escala teórica del grado de partición de los residuos de aminoácidos, entre la superficie y el interior de la proteína

(Janin 1979). Esto ha sugerido que hélices  $\alpha$  con valores por arriba de 0.2 kcal/mol por residuo, sean consideradas fuertemente candidatas para formar hélices  $\alpha$  de tipo anfipática (Segrest y col., 1992). De modo análogo, los valores de  $\mu H$  en una hélice  $\alpha$  contribuyen al momento hidrofóbico promedio ( $\mu H_{prom}$ ) de una proteína (Bolaños-García y col., 1997). Por lo tanto, el  $\mu H_{prom}$  de una proteína se calcula con base en la ecuación 2.

$$\mu H_{prom} = \frac{\sum_{i=1}^{i=\alpha} N_i (\mu H)_i}{\sum_{i=1}^{i=\alpha} N_i} \quad (2)$$

Donde  $\alpha$  corresponde al número de hélices  $\alpha$  en la proteína y  $N_i$  al número de segmentos de una hélice  $\alpha$  con el momento hidrofóbico  $(\mu H)_i$ .

### ***Reconstitución de las apolipoproteínas en solución de fosfatos***

Las apolipoproteínas intercambiables AI y CIII liofilizadas y aisladas de plasma humano, se compraron en la compañía Sigma Chemical Co. (San Louis, MO), mientras que las apolipoproteínas intercambiables CI y AII se compraron en la compañía Perlimmune Incorporation, USA (pureza mayor de 98 %). La apo E3 fue donada por el Dr. Karl Weisgraber (Gladstone Institute for Cardiovascular Research, San Francisco, CA).

Las apolipoproteínas intercambiables humanas CIII, AI, AII y E3 fueron resuspendidas a una concentración de 0.2 mg/ml en una solución de fosfatos de sodio de 20 mM, pH 8.0, utilizando agua Milli-Q (Nanopure-UV). La solución de fosfatos fue filtrada por membranas de 0.22  $\mu m$  para eliminar posibles contaminantes.

### ***Reconstitución del fosfolípido en cloroformo***

El dipalmitoil fosfatidil colina [DPPC (> 99 %)] fue obtenida de Fluka Chemie AG y se disolvió en cloroformo (99 % grado HPLC, Aldrich USA) a una concentración final de 1 mg/ml para formar la solución de dispersión.

### ***Cuantificación de proteína***

Los valores de los coeficientes de extinción molar estimados de manera experimental para las apolipoproteínas AII, CIII, AI y E3, se calcularon con base en la ecuación 3.

$$A = \epsilon \cdot l \cdot C \quad (3)$$

Donde A= absorbancia de la muestra de proteína a la longitud de onda como valor máximo, l= longitud de paso de luz en cm,  $\epsilon$ =coeficiente de extinción molar (expresado en litro/moles\*cm) y C= concentración de proteína (expresado en moles/litro). El valor del coeficiente de extinción molar a 280 nm fue obtenido de acuerdo al procedimiento descrito por Pace y col. (1995) usando la ecuación 4:

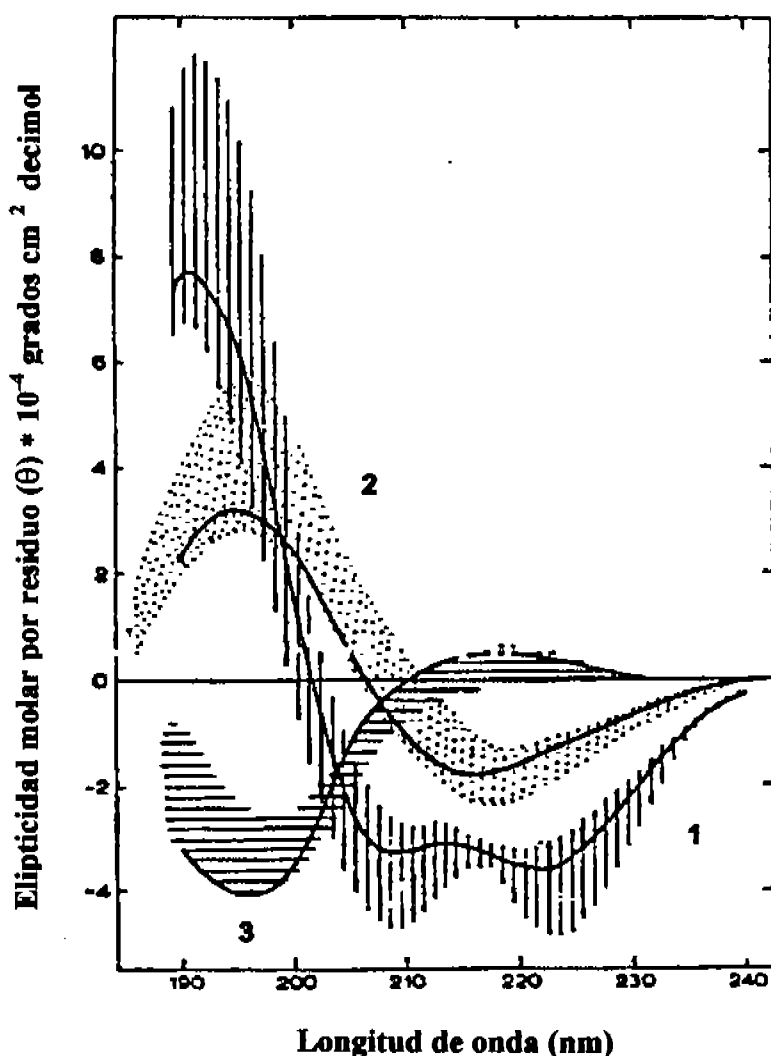
$$\epsilon_{(280\text{nm})} = (\# W) 5,500 + (\# Y) 1,490 + (\# C)125 \quad (4)$$

Donde  $\epsilon$  = coeficiente de extinción molar a 280 nm, W= Triptófano, Y= Tirosina y C= Cisteína.

### ***Determinación de los tipos y porcentajes de estructura secundaria de las diferentes apolipoproteínas mediante dicroísmo circular***

La técnica de dicroísmo circular es utilizada para medir la actividad óptica de las moléculas asimétricas en solución como proteínas y ácidos nucleicos. Debido a la poca disponibilidad de instrumentos de alta precisión como NMR y difracción de rayos X de sincrotrón, el dicroísmo circular se ha convertido en una técnica estándar para determinar el contenido de estructura secundaria de macromoléculas, conformación de proteínas y ácidos nucleicos. También puede medirse la estabilidad termodinámica de las proteínas en solución como una función a la temperatura, pH y agentes desnaturizantes orgánicos.

Las bandas de dicroísmo circular en proteínas ocurren en dos regiones del espectro: la región de 170 a 250 nm está determinada por contribuciones de enlace peptídicos, mientras que la banda en la región 250 a 300 nm se origina a partir de los residuos de aminoácidos aromáticos (tirosina, fenilalanina y triptófano). Estas dos regiones del espectro presentan diferentes clases de información acerca de la estructura secundaria proteica: estructura hélice  $\alpha$ , estructura hoja  $\beta$  plegada paralela o antiparalela y estructura al azar (Bazzi y Woody 1985; Johnson 1990). En la figura 1 se pueden observar los espectros de dicroísmo circular para los diferentes tipos de estructuras secundarias.



**Figura 1.** Espectros de dicroísmo circular mostrando las diferentes conformaciones para tres proteínas diferentes: estructura hélice  $\alpha$  (1), estructura beta (2) y estructura al azar (3).

Mediante dicroísmo circular se evaluó la estabilidad y la integridad de las apolipoproteínas CI, CIII, AII, E3 y AI, previo a la preparación de las monocapas de Langmuir. Para obtener la mejor señal de dicroísmo circular en un intervalo de 170-250 nm, las apolipoproteínas fueron resuspendidas en una solución de fosfatos 20 mM, pH 8.0 a una concentración de 0.2 mg/ml. Para estabilidad la integridad de cada una de estas proteínas, fueron sometidas a temperaturas que oscilan entre 20 - 90°C con incrementos de 10°C entre cada intervalo y con un tiempo de equilibrio de 10 minutos. También fueron sometidas a una fuerza iónica utilizando 3.5 M de cloruro de potasio (KCl). El contenido de hélice  $\alpha$  para cada apolipoproteína se calculó usando el programa PROSEC 3.1 (Aviv Associates Inc., NJ).

Los espectros de dicroísmo circular se registraron en un espectropolarímetro Aviv 62DS utilizando celdas de cuarzo de 0.1 cm de paso de luz, con un ancho de banda de 1.5 nm, tiempo de integración de 0.3 segundos cada 0.5 nm y a lo largo de la región 180-250 nm del espectro electromagnético. Los datos se reportan como elipticidad molar por residuo promedio y en unidades de grado por centímetro cuadrado por decimol.

La elipticidad molar por residuo promedio [ $\{\theta\}_{\text{experimental}}$ ] se calculó con base en la ecuación 5.

$$[\theta] = \frac{[\{\theta\}_{\text{experimental}}]}{[\text{MRC}] [\text{Longitud de la celda}] [10]} \quad (5)$$

La concentración promedio por residuo de aminoácido [MRC] se calculó con base en la ecuación 6:

$$[\text{MRC}] = \frac{[\text{Concentración en mg/ml}] [\text{número de aminoácidos}]}{[\text{Peso molecular}] [\text{número de cadena}]} \quad (6)$$

## ***Monocapas de Langmuir***

Las monocapas de Langmuir son películas de una molécula de espesor localizadas en una interfase aire/agua. Comúnmente son moléculas anfifílicas con una región hidrofílica y otra hidrofóbica que permiten formar un sistema en dos dimensiones manejando dos variables termodinámicas: la temperatura y la presión lateral (diferencia de tensión superficial del agua pura y el agua con la monocapa en la superficie). Únicamente cambiando la cabeza o la cola de las moléculas o bien cambiando el pH y la fuerza iónica de la subfase, se puede variar la interacción de la monocapa con el sustrato y la interacción intermolecular.

Durante muchos años se han estudiado a los ácidos grasos en sistemas de monocapas de Langmuir en una interfase aire/agua. Los cambios de organización que se han observado en las diferentes isothermas de presión lateral *versus* área durante la compresión lateral de la monocapa, han permitido construir el diagrama de fase de los ácidos grasos. El área de la monocapa se determina moviendo las barreras de Teflón de la palangana sobre la superficie del agua y la presión lateral  $\Pi$  se determina midiendo la diferencia entre la tensión superficial del agua sin la monocapa y la tensión superficial del agua con la monocapa en la superficie.

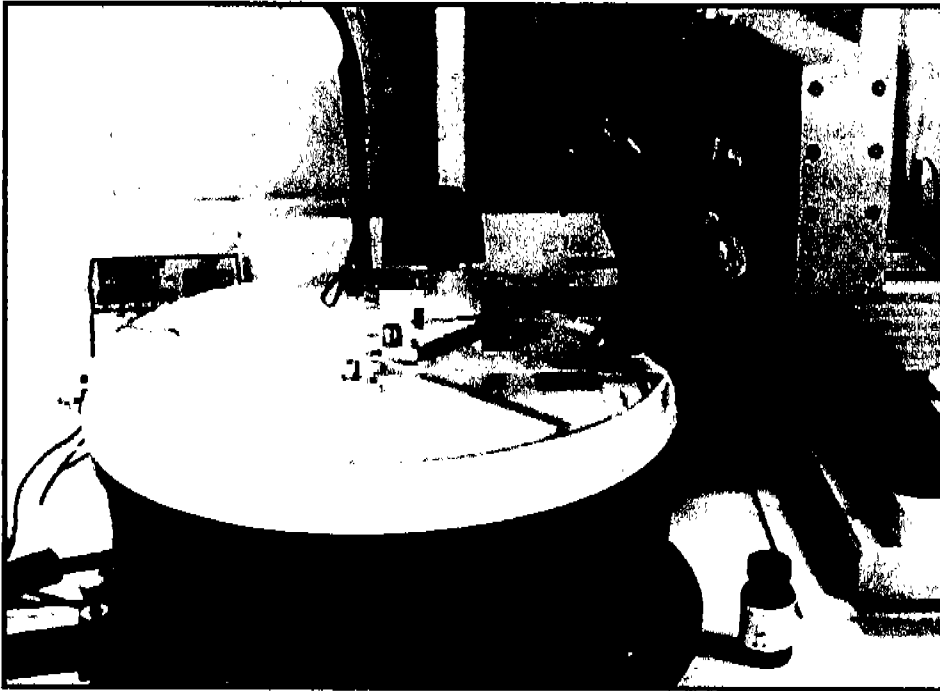
Durante el comienzo de la compresión lateral de la monocapa de ácidos grasos, la presión lateral se encuentra a  $\Pi \sim 0$  mN/m y área de un intervalo  $a \sim 300-1500$  Å<sup>2</sup>/molécula. A esta presión-área se presenta una fase gaseosa, con moléculas que presentan interacciones muy débiles de tipo intermolecular e intramolecular siendo despreciables. Al reducir el área/molécula, la monocapa entra en la región de la fase líquida expandida (*L*). En esta fase como en la fase gaseosa, no se detecta difracción de rayos X. Reduciendo aún más el área/molécula de la monocapa, da lugar a otra transición de líquido expandido a una fase condensada (*L/LC*). Esta transición de fase se presenta en la isoterma como una meseta que indica una transición de primer orden. Una segunda transición de fase se presenta en el estado líquido condensado y se observa a través de una compresión mayor de la monocapa ( $a \sim 22-25$  Å<sup>2</sup>/molécula). Esta área es apenas un poco mayor que el área de compresión transversal de una cadena completamente extendida. De hecho, la fase condensada está formada por una variedad de mesofases. A bajas presiones superficiales se encuentran varias fases

mostrando moléculas inclinadas con diferentes simetrías, mientras que a presiones muy altas todas las fases se colapsan en multicapas.

La palangana de Langmuir (Model TKB 2410<sup>a</sup>, Nima Technology Ltd., England) consta principalmente de una interfase digital y de un software para controlar el área y la presión lateral, así como graficar los datos experimentales de la isoterma presión lateral vs área. La parte principal del instrumento es la palangana fabricada con teflón (PTFE sólido), que se utiliza para garantizar la limpieza del equipo (Figura 2). La palangana está en contacto con un compartimiento que funciona como baño térmico. El agua debe estar hasta el borde de la palangana ocupando aproximadamente 2 litros, procurando que forme un menisco para que las barreras que delimitan el área en donde es confinada la monocapa esté en contacto con el agua. La base de la palangana está construida con aluminio y presenta una altura aproximada de 25 cm. Entre la base y la palangana se encuentra un tubo neumático anular que sirve para aislar todo tipo de vibraciones que se producen en el medio. La palangana cuenta con dos barreras que se mueven sincronizadamente en direcciones opuestas, moviéndose sobre los bordes de la palangana para ampliar o reducir el área de interés. La velocidad de movimiento de las barreras es controlada por un software incluido en el equipo, regulando el voltaje de los motores a través de dos voltímetros que mueven a las barreras hechas de PTFE y recorren una área de trabajo de 30-1000 cm<sup>2</sup>. El software permite utilizar un intervalo de velocidad de entre 20-1000 cm<sup>2</sup>/minuto, pero las velocidades recomendadas en los experimentos, oscilan en un intervalo de 30-80 cm<sup>2</sup>/minuto para procurar una compresión o expansión cuasiestática.

### ***Determinación de la presión lateral***

Para medir la presión lateral se utiliza una placa de Wilhelmy como lo recomienda la internacional Standard ISO 304. La placa de Wilhelmy es una tira de papel filtro de 10 mm de ancho, que cuando se suspende en una interfase aire/agua la tensión superficial del agua lo atrae hacia el interior de la subfase. Si se deposita la muestra en la superficie del agua, la tensión superficial del agua se reduce para minimizar la energía libre de la superficie y la fuerza que actúa sobre el papel filtro se mide mediante un galvanómetro.



**Figura 2.** Palangana de Langmuir acoplada al microscopio de ángulo de Brewster.

Las fuerzas que actúan sobre el papel filtro son la gravedad, la tensión superficial y el empuje debido al agua desplazada, el papel filtro presenta dimensiones  $l$   $w$   $t$  (longitud, ancho y grosor), una densidad  $\rho$  y está sumergido en el agua a una altura  $h$ ; entonces la fuerza  $F$  que actúa sobre el papel filtro puede ser descrita de acuerdo a la ecuación 7.

$$F = (\rho lwt)g - (\rho' hwt)g + 2\gamma(w + t) \cos\theta \quad (7)$$

Donde  $\gamma$  es la tensión superficial del agua,  $\theta$  es el ángulo de contacto ( $0^\circ$  para el papel filtro completamente mojado),  $g$  es la aceleración debido a la gravedad ( $10 \text{ N/Kg}$ ) y  $\rho'$  es la densidad de la subfase. La diferencia entre las fuerzas,  $\Delta F$ , sobre la placa de Wilhelmy cuando se sumerge en agua pura y agua cubierta con un surfactante en la superficie, se obtiene la ecuación 8.



$$\Delta F = 2(\gamma' - \gamma)(t + W) \quad (8)$$

Donde  $\gamma'$  es la tensión del agua pura ( $72.8 \text{ mN/m}$ ).

Si consideramos que el papel filtro tiene  $w = 1 \text{ cm}$  de ancho y su grosor es insignificante respecto de la anchura, se obtiene la ecuación 9.

$$\Delta F = 2\Delta\gamma \quad (9)$$

Donde  $\Delta\gamma$  es la diferencia entre la tensión superficial del agua pura y el agua cubierta con surfactante y se define como la presión superficial  $\Pi$  con base en la ecuación 10.

$$\Delta\gamma = \gamma' - \gamma = \Pi \quad (10)$$

$\Delta\gamma$  puede ser expresado en términos de la presión superficial y la fuerza se mide dinas ( $1 \text{ dina} = 10^{-5} \text{ newtons}$  y un  $\text{dina/cm} = 1 \text{ mN/m}$ )

$$\Delta\gamma = \Pi \quad (11)$$

$$\Delta F = 2\Pi \quad (12)$$

Con las ecuaciones 11 y 12 se puede medir la presión lateral de la monocapa, que consiste en la diferencia entre la tensión superficial del agua pura y la tensión superficial del agua cubierta con la monocapa. El intervalo de presiones que puede medir este instrumento es de  $0-100 \text{ mN/m}$  con una exactitud de  $0.1 \text{ mN/m}$ .

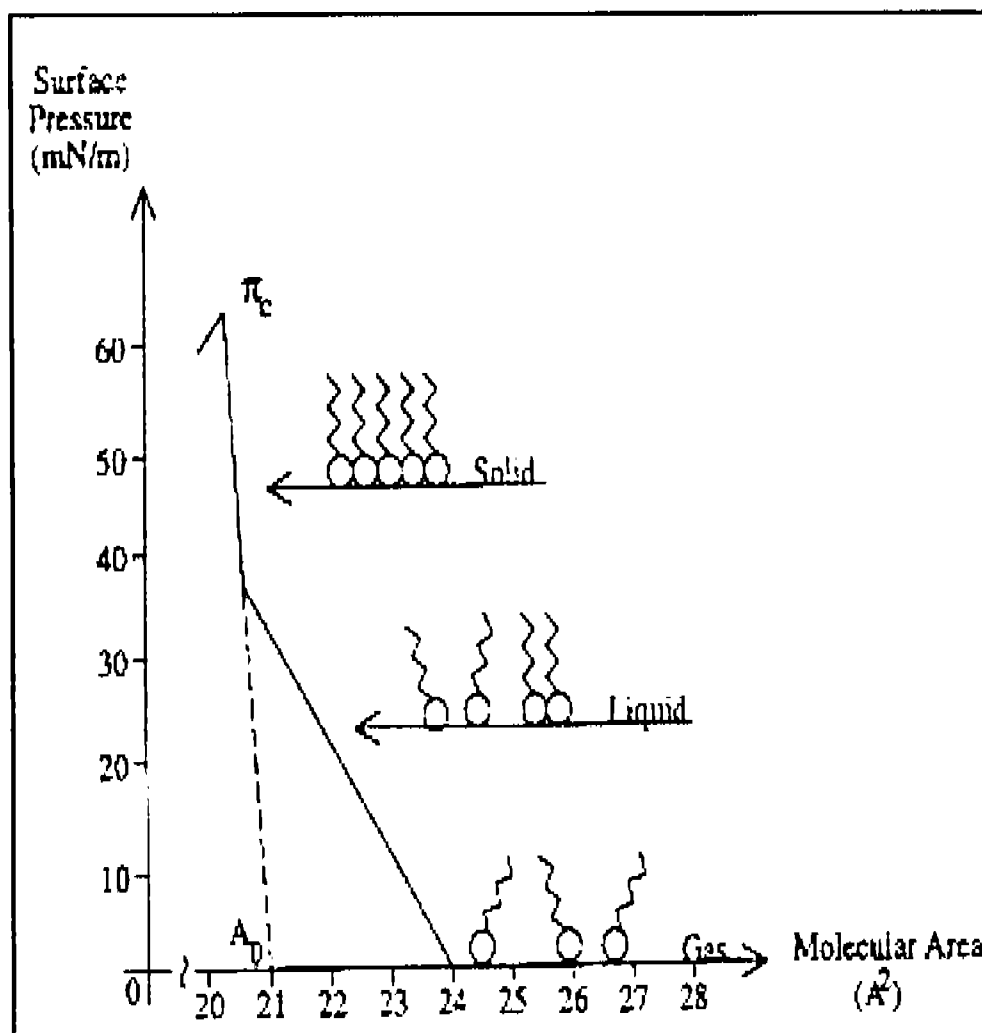
### ***Isotermas***

Durante la compresión de una monocapa de Langmuir se obtiene una isoterma típica de presión lateral *versus* área. A lo largo de la isoterma, se observan los diferentes estados de organización que se presentan en una monocapa comenzando con un estado gaseoso (G) en dos dimensiones. Cuando se reduce el área por molécula, la monocapa cambia de un estado gas a un estado líquido expandido (L), pasando por una coexistencia de (G/L). A mayor incremento en la presión lateral y a una reducción de área, se obtiene otra transición de fase de un estado líquido expandido a un estado condensado (L/LC). En la figura 3 se pueden observar los diferentes estados y transiciones de fase para un ácido graso.

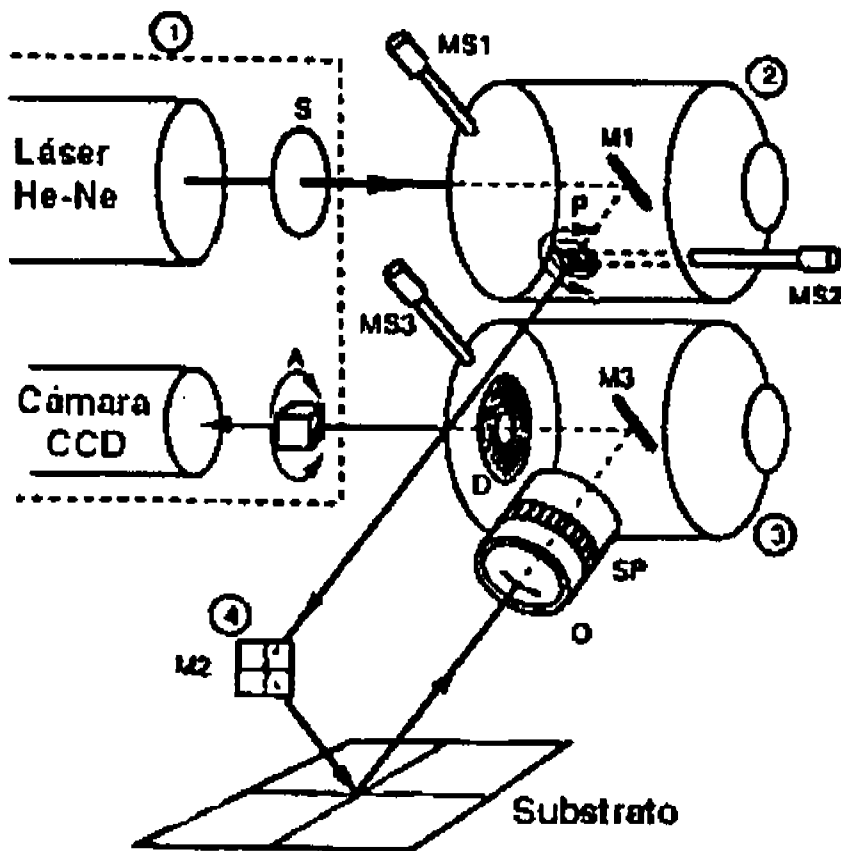
### ***Microscopio de ángulo de Brewster***

La microscopía de ángulo de Brewster es una técnica relativamente nueva que permite la observación directa de las monocapas en la interfase agua/aire durante la compresión lateral. Esta técnica se basa en el estudio de la luz reflejada proveniente de una interfase iluminada por un rayo láser polarizado  $p$  en el plano de incidencia, formando un ángulo  $\theta$  de 53.1 grados conocido como ángulo de Brewster. Cuando el ángulo de incidencia del rayo láser es el ángulo de Brewster no se refleja luz en una interfase limpia y perfecta; es decir, el índice refractivo cambia abruptamente de un medio a otro. Para una interfase real se tiene una región de transición, donde el índice refractivo cambia suavemente de un valor a otro. La intensidad de luz reflejada en el ángulo de Brewster es mínima, pero no desaparece completamente. Esta luz reflejada depende fuertemente de las características de la interfase, densidad molecular y anisotropía molecular. Estas propiedades son modificadas particularmente cuando una monocapa se localiza en la interfase aire/agua. Por lo tanto, una monocapa sobre una interfase es capaz de producir un reflejo de luz en fases inclinadas, donde la anisotropía es suficientemente fuerte como para tener reflexión, y hacer visible el mosaico de texturas debido a los dominios inclinados. Las transiciones de fase son más visibles cuando se presenta un cambio en el grado de contraste, alteración repentina del mosaico de texturas o como cambios en los dominios de los bordes.

Todas las observaciones correspondientes con MAB se realizaron utilizando un instrumento MAB1 plus (Nano Technologie GMBH, Alemania) con una resolución espacial de 4  $\mu\text{m}$  aproximadamente. Experimentalmente se ilumina la interfase a una incidencia de Brewster ( $\sim 53.1$  grados) con un haz de alta intensidad de un láser polarizado  $p$  de láser He-Ne (632.8 nm) (Figura 4). La intensidad de luz reflejada es recibida directamente por un microscopio a través de un analizador de polarización, recibiendo la señal una cámara de video CCD (Höning D y Möbius 1991; Henon y Meunier 1991).



**Figura 3.** Diagrama de una isoterma típica de presión lateral *versus* área.



**Figura 4.** Diagrama de la trayectoria que sigue el láser en el MAB1. Ajustador del espejo M1 (MS1). Ajustador del polarizador P (MS2). Ajustador del espejo M3 (MS3). Enfoque (SP). Objetivo (O).

#### ***Preparación de las monocapas de Langmuir de las diferentes apolipoproteínas***

Las apolipoproteínas intercambiables humanas AI, AII, CIII y E3 fueron resuspendidas en una solución de fosfatos 20 mM, pH 8.0 y se filtraron a través de un filtro de membrana de 0.22  $\mu\text{m}$ . Posteriormente para formar monocapas de Langmuir, las proteínas fueron dispersadas sobre la superficie de una misma solución de fosfatos con 3.5 M de KCl a pH 8.0. Es importante mencionar que antes de la preparación de estas soluciones, el KCl fue horneado durante 8 horas a 300°C para eliminar posibles contaminantes, como compuestos orgánicos. La solución de fosfatos fue preparada utilizando agua destilada pasando por un sistema purificador de agua Milli-Q (Millipore

Corp.) para adquirir una resistividad final de 18.3 M $\Omega$ /cm (Nanopure-UV). Posteriormente el agua se pasó por un filtro de 0.1  $\mu$ m antes de ser utilizada.

El depósito de la proteína en solución se realizó cerca de la subfase con una micro jeringa Hamilton dejando caer gota por gota en diferentes puntos de la superficie para evitar la degradación de la proteína y la formación de agregados o multicapas. Posteriormente se mantuvo por 30 minutos de reposo para que el sistema alcanzara el equilibrio y se comprimiera la monocapa a una velocidad de alrededor de 50  $cm^2/minuto$ . La temperatura del sistema se mantuvo constante en 25°C con ayuda de un baño térmico (Cole-Parmer 1268-24, USA).

### ***Preparación de monocapas binarias de DPPC con apolipoproteínas CI y AII***

Para obtener monocapas binarias de DPPC/apolipoproteínas se utilizaron los métodos de inyección y de dispersión/disolución. 1) El método de inyección consiste en dispersar el DPPC disuelto en cloroformo sobre la superficie de una solución de fosfatos (20 mM, pH 8.0 y 25°C). Después de 15 minutos de equilibrio el cloroformo se evapora y entonces se depositan las apolipoproteínas (CI y AII) por debajo de la monocapa de DPPC utilizando volúmenes de 50-250  $\mu$ l. Las proteínas se depositan por fuera de las barreras que delimita el área de interés para evitar perturbaciones en la monocapa de DPPC. Con un tiempo de equilibrio de varias horas se alcanzó la adsorción de las apolipoproteínas en la monocapa de DPPC de manera apropiada y a una velocidad de expansión mínima (15  $cm^2/minuto$ ) se abren las barreras hasta que la presión lateral se desvanece (0  $mN/m$ ). Posteriormente con tiempos de 30 minutos de equilibrio, la monocapa de DPPC/apo se comprime a una velocidad de 50  $cm^2/minuto$ , obteniendo una isoterma típica. 2) El método de dispersión y disolución consiste en incorporar a las proteínas sobre la interfase de aire/agua de una solución de fosfatos, depositando gota por gota hasta cubrir el área de interés para evitar la formación de agregados o multicapas. Después de 15 minutos de equilibrio una cantidad específica de DPPC se dispersa sobre la superficie de la subfase que contiene a las proteínas para obtener una monocapa de Langmuir de DPPC/proteína. Cuando se dispersa el fosfolípido sobre la proteína, la presión lateral se incrementa de manera muy rápida, debido a la adsorción de la proteína por la monocapa de DPPC cuyo valor de  $\Pi$  es semejante al que se obtiene mediante el método de inyección. Posteriormente entre un tiempo de 10-15

minutos de equilibrio, la monocapa binaria se expande hasta desvanecer totalmente la presión lateral y 30 minutos después se lleva a cabo el proceso de compresión.

### ***Características generales de una película de Langmuir-Blodgett***

La técnica de LB se ha utilizado ampliamente para estudiar diferentes moléculas con características anfifílicas como proteínas, DNA, fosfolípidos y ácidos grasos. Para obtener una película de LB, las monocapas de Langmuir se transfieren de la interfase aire/agua a diferentes presiones laterales a un sustrato sólido (mica) para formar películas delgadas bien ordenadas. Sin embargo, antes de producir una película de LB se realiza una isoterma de la monocapa que formará la película de Langmuir, con la finalidad de determinar las condiciones en que se realizará el depósito tomando en cuenta la presión lateral, el área molecular, las diferentes transiciones de fase y dominios. La técnica LB incluye varias ventajas: 1) una monocapa de proteína en la interfase aire/agua puede ser transferida después de establecer una organización molecular de la película en diferentes presiones laterales; 2) una monocapa de proteína formada en una interfase aire/agua puede ser transferida a varios sustratos sólidos; 3) pueden obtenerse multicapas de proteínas mediante la repetición de los procesos de transferencia de monocapas a sustratos sólidos; 4) la película transferida puede estudiarse mediante técnicas de microscopía de fuerza atómica y microscopía de fluorescencia (Knobler 1990; Lösche y col., 1983; 1984; Möhwald 1990; 1998; Bhushan y col., 1995; Knapp y col., 1995; Overney y col., 1992).

### ***Preparación de películas hidrofílicas de LB de las apolipoproteínas CI y AII***

Para obtener películas de LB se realizaron transferencias de las monocapas de apolipoproteínas CI y AII en mica hidrofílica a una velocidad de ~2 mm por minuto, usando una cámara Nima LB. Con base en las isotermas de las apolipoproteínas, las transferencias se realizaron justo en la fase *L* a  $\Pi \sim 20$  mN/m con ambas proteínas y en la fase *LC* a  $\Pi \sim 43$  mN/m para la apo CI y a 38 mN/m para la apo AII. Para sustratos hidrofílicos, las monocapas de ambas proteínas fueron transferidas únicamente sobre mica. El clivado fue justo antes del depósito. De este modo, la superficie hidrofóbica de la proteína está orientada hacia el aire, mientras que la superficie hidrofílica queda expuesta sobre la mica.

Cuando las películas de LB de ambas proteínas son transferidas en mica hidrofílica, éstas contienen una gran cantidad de KCl que proviene de la subfase lo que representa un problema al realizar barridos con el MFA. Cualquier intento por remover el KCl con agua Milli-Q también removerá la proteína. Por consiguiente, los barridos se realizaron con el MFA justo después de la preparación de las películas de LB, ya que son altamente higroscópicos o en zonas donde no existieran cristales de sal. Para mantener hidratadas a las películas LB de ambas proteínas, las muestras se trasladaron en una caja NIMA bajo condiciones de humedad.

### ***Preparación de monocapas hidrofóbicas de OTE***

Con base en el procedimiento de Wood y Sharma (1994; 1995) se realizaron varios experimentos en superficies de mica cubiertas con OTE para generar películas hidrofóbicas por medio de depósitos de LB. El OTE fue comprado en Lancaster Sythesis Ltd con una pureza del 94 % y se disolvió en cloroformo a una concentración de 1 mg/ml.

Las superficies de mica se introducen en una subfase de agua acidificada con HCl HNO<sub>3</sub> para obtener un pH 2.0 a una temperatura de 23°C. Previamente la mica fue activada al exponerla a un plasma de aire/agua generado por un radio de frecuencia (~2 minutos a ~30 W, 100 mTorr). Una solución de OTE en cloroformo se dispersa sobre la superficie aire/agua y 15 minutos después se evapora y se obtiene la polimerización del OTE. El grado de polimerización de la monocapa de OTE se observó mediante MAB. La transferencia de la monocapa de OTE a la mica se realizó justo a una presión lateral de 10-12 mN/m y a una velocidad 1 mm/minuto. Después de transferir la monocapa de OTE, las superficies hidrofóbicas fueron horneadas y templadas al vacío a una temperatura y presión de 100° C y 100 mTorr durante dos horas.

### ***Preparación de películas hidrofóbicas de LB de las apolipoproteínas C1 y AII***

Las monocapas de las apolipoproteínas C1 y AII fueron transferidas durante la fase L a una presión lateral de 20 mM/m sobre una superficie de una película de LB de OTE contenida sobre mica. La superficie hidrofóbica de las monocapas de proteína interacciona con la superficie hidrofóbica de OTE, mientras que la superficie hidrofílica se orienta hacia el aire. Sin embargo, no se realizaron transferencias de monocapas de

las apolipoproteínas CI y AII durante la fase LC a una superficie hidrofóbica, debido a que una región hélice  $\alpha$  de cada cadena polipeptídica en ambas proteínas se encuentra desprendida de la interfase aire/agua. Por lo tanto, el proceso de depósito destruiría la nueva conformación de la proteína obtenida en la fase LC debido a la fuerte interacción hidrofóbica entre las superficies hidrofóbicas de las hélices  $\alpha$  y las superficies de los sustratos hidrofóbicos. Las monocapas de ambas proteínas fueron colocadas sobre mica hidrofóbica dentro de un vaso de precipitado conteniendo la misma solución de fosfatos. Esta solución fue diluida con agua Milli-Q para remover completamente el KCl sin afectar las monocapas de ambas proteínas y después de eliminar la sal de KCl de las películas de LB en ambas proteínas, se realizaron los barridos con MFA. Las películas de LB de las apolipoproteínas CI y AII transferidas a sustratos hidrofóbicos libres de sal son más estables y fáciles de manejar que las proteínas transferidas en mica hidrofílica.

### ***Microscopía de fuerza atómica***

La técnica de microscopía de fuerza atómica consiste en analizar la superficie de una muestra con una punta fina o micro-sensor de varias micras de longitud y menos de 100 Å de diámetro. La punta se localiza en el extremo libre de un soporte (cantilever) de 100 a 200 micras de longitud. La fuerza que se produce entre la punta y la superficie de la muestra produce deflexiones en el soporte que son medidas mientras la punta rastrea la muestra que es movida por debajo de la punta. Un detector mide las deflexiones del soporte, mientras que varias fuerzas (van der Waals) contribuyen a la deflexión del cantilever. Con el objeto de obtener un barrido más preciso se realiza en tres direcciones (X, Y y Z) a través de un sistema piezoeléctrico. Este sistema desplaza a la muestra en el plano X y Y, utilizando un método previamente programado, ya que la superficie de la muestra es trazada por la distancia del sensor que se mantiene siempre constante. La señal generada por el eje Z durante el análisis corresponde a cada punto de coordenada de acuerdo a los ejes X y Y. El sensor encargado de detectar las deflexiones del soporte puede ser de dos clases: interferométrico y de deflexión del rayo luminoso. La luz del diodo láser es reflejada especularmente por la superficie del cantilever, mientras que la luz desviada es detectada por un fotodetector sensible a posición. Después de que la señal pasa por el fotodetector, ésta llega a una



computadora para simular imágenes tridimensionales. En la figura 5 se muestra un esquema de la trayectoria que sigue el diodo láser. Los dos métodos más comunes que se usan en un MFA son de contacto y contacto intermitente "modo tapping". Existen dos diferentes formas de producir imágenes en el modo contacto: altura constante y fuerza constante.

El MFA ha sido ampliamente utilizado para estudiar superficies de películas de LB de diversos materiales biológicos como: estructuras de proteínas, membranas biológicas, ácidos nucleicos y cristales de virus *in situ*. Las imágenes tridimensionales que se obtienen de las muestras son de alta resolución del orden de ángstroms (Bining y col., 1986).

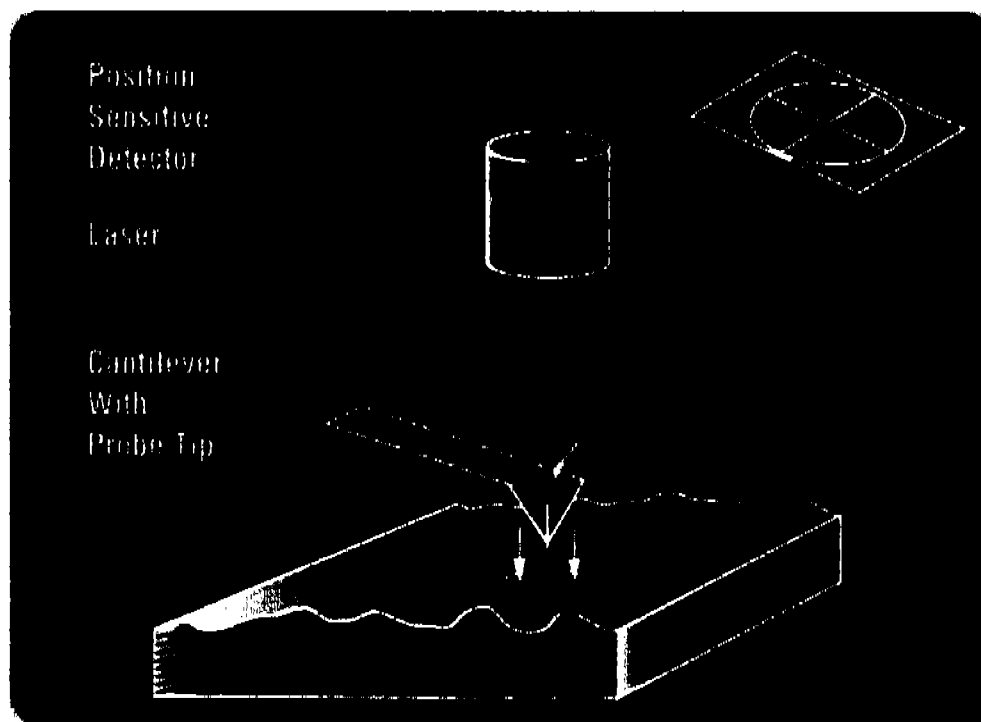
**Modo contacto.** También es conocido como modo repulsivo y básicamente existen dos formas para producir imágenes usando este modo: altura constante y fuerza constante. El de uso más frecuente es el de fuerza constante, donde el ángulo que forma el cantilever con respecto a un haz de luz se mantiene constante durante un barrido por medio de un circuito electrónico cerrado que ajusta la posición vertical del piezoeléctrico. La punta del microscopio está sujeta en un extremo libre del cantilever con una constante de elasticidad ligeramente menor a la muestra. Durante el barrido de la muestra, las fuerzas repulsivas de van der Waals mantienen constante la distancia que se produce entre la punta del microscopio y la superficie de la muestra inmovilizada en un piezoeléctrico.

Existen otras dos fuerzas que actúan durante un barrido en el modo contacto: una fuerza capilar ejercida por capas de agua presente en el medio ambiente y la fuerza producida por el soporte mismo. La fuerza capilar surge cuando una película de agua se dispone alrededor de la punta, aplicando una fuerza atractiva ( $10^{-8}$  N) que mantiene la punta y la muestra. La magnitud de la fuerza depende sobre todo de la separación entre la muestra y la punta. La fuerza ejercida por el soporte es semejante a la fuerza ejercida a un resorte comprimido. La magnitud y fuerza de atracción-repulsión del soporte depende básicamente de su deflexión y su constante de elasticidad.

La fuerza capilar debe mantenerse estable, mientras que la punta se encuentre en contacto con la muestra, ya que la distancia entre éstas debe permanecer constante siempre que la capa de agua sea homogénea. La fuerza que varía en el modo contacto es la fuerza ejercida por el soporte. La fuerza total que ejerce la punta en la muestra es

la suma de la fuerza del capilar y la fuerza del cantilever y puede ser balanceada por las fuerzas repulsivas de van der Waals (Bining y col., 1986).

**Modo no contacto.** El modo no contacto de fuerza atómica, es una de las técnicas en las cuales el soporte vibra cerca de la superficie de la muestra y cuya distancia con la punta es del orden de diez a cientos de ángstrom. El modo no contacto usa detección de la frecuencia de resonancia del soporte como una medida indirecta de la topografía de la muestra. Esta técnica es importante, ya que permite analizar la superficie de una muestra sin que la punta entre en contacto con ella. La fuerza total entre la punta y la muestra ( $10^{-12}$  N) es muy baja, medida favorable para superficies uniformes o muestras elásticas. Los soportes usados en el modo no contacto deben ser más rígidos que los del modo contacto, ya que los soportes más suaves pueden entrar en contacto con la superficie estudiada.



**Figura 5.** Diagrama de la trayectoria que sigue el láser en el microscopio de fuerza atómica.

**Modo contacto intermitente.** Este modo es similar al modo no contacto, excepto que en el modo intermitente, el soporte en vibración se acerca más a la muestra y su amplitud de vibración es mayor; de tal forma, que durante el barrido toca ligeramente a la muestra. En el modo intermitente la amplitud de vibración del soporte cambia respondiendo al gradiente de la fuerza que varía con la distancia entre la punta y la muestra. El modo contacto intermitente se recomienda cuando se desean obtener imágenes de un barrido de varios milímetros y es muy posible encontrar fuertes variaciones de topografía.

### ***Observaciones con el microscopio de fuerza atómica***

Las monocapas de apolipoproteína fueron transferidas a sustratos hidrofílicos e hidrofóbicos para ser analizadas con dos microscopios de fuerza atómica: microscopio NanoScope IIIa SPM (Digital Instruments, California, USA.) con una área de barrido de 15 X 15  $\mu\text{m}$  y microscopio JSTM-4200 JEOL (JEOL, Japan) "scanning probe microscope" con una área de barrido de 10 X 10  $\mu\text{m}$ . De manera preliminar, en todos los casos se realizaron barridos a diferentes frecuencias para determinar el área específica a estudiar. Así mismo se utilizaron tanto el modo de contacto como de contacto intermitente, con la finalidad de obtener imágenes topográficas de deflexión y fase. Para estos barridos se utilizaron puntas de  $\text{Si}_3\text{N}_4$  con una constante de una fuerza típica de  $0.3 \text{ Nm}^{-1}$  para el caso del instrumento Digital y puntas de silicio de  $\sim 40 \text{ Nm}^{-1}$  para el instrumento JEOL. Para mejorar la adquisición de imágenes y de datos, se realizaron barridos en regiones planas utilizando el modo contacto átomos del instrumento Digital. La velocidad final de barrido fue de 1 Hz y las imágenes fueron analizadas usando los programas proporcionados por las compañías Digital y JEOL. Con el objeto de evitar problemas de ruido, se realizaron barridos a velocidades de 30 a 50 Hz a diferentes ángulos, los cuales fueron modificados a diferentes tiempos.

Las películas LB hidrofílicas de apolipoproteínas transferidas en mica plana presentan pequeños cristales de KCl a lo largo de su superficie, dificultando los barridos con el microscopio. Primeramente, se hicieron barridos a magnificaciones bajas para buscar áreas libres de cristales de KCl, permitiendo realizar los barridos a alta resolución. Los barridos de MFA en áreas planas sin la presencia de cristales de KCl en

la mica, permiten que las puntas no se destruyan y por lo tanto se obtengan imágenes reales.

Para evitar la formación de cristales de KCl, las películas de LB hidrofóbicas de ambas proteínas se introdujeron en un vaso de precipitado conteniendo la misma solución de fosfatos con 3.5 M de KCl, se realizaron diluciones con agua Milli-Q para eliminar la presencia de sal en las películas de LB hidrofóbicas.

## Referencias

97. Bazzi MD, Woody RW. Oriented secondary structure in integral membrane proteins. I. Circular dichroism and infrared spectroscopy of cytochrome oxidase in multilamellar films. *Biophys J*. 1985. **48**: 957-966.
98. Bhushan B, Israelachvili JN, Landman U. Nanotribology: friction, wear and lubrication at the atomic scale. *Nature*. 1995. **374**: 607-616.
99. Binnig G, Quate CF, Gerber Ch. Atomic Force Microscope. *Phys. Rev. Lett*. 1986. **56**: 930-933.
100. Eisenberg D, Weiss RM, Terwilliger TC. The helical hydrophobic moment: a measure of the amphiphilicity of a helix. *Nature*. 1982. **299**: 371-374.
101. Eisenberg D, Weiss RM, Terwilliger TC. The hydrophobic moment detects periodicity in protein hydrophobicity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984. **81**:140-144.
102. Janin J. Surface and inside volumes in globular proteins. *Nature*. 1979. **8**: 491-492.
103. Johnson WC Jr. Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide. *Proteins*. 1990. **7**: 205-214.
104. Knapp HF, Wiegrabe W, Heim M, Eschrich R, Guckenberger R. Atomic force microscope measurements and manipulation of Langmuir-Blodgett films with modified tips. *Biophys J*. 1995. **69**: 708-715.
105. Lösche M, Rabe J, Fisher A, Rucha BU, Knoll W, Möhwald H. Microscopically observed preparation of Langmuir-Blodgett films. *Thin Solid Films*. 1984. **117**: 269-280.
106. Möhwald H. Phospholipid and phospholipid-protein monolayers at the air/water interface. *Annu Rev Phys Chem*. 1990. **41**: 441-476.
107. Overney RM, Meyer E, Frommer J, Brodbeck D, Luthi R, Howald L, Guntherodt HJ, Fujihira, Takano H, Gotoh Y. Friction measurements on phase-separated thin films with a modified atomic force microscope. *Nature*. 1992. **359**:133-135.
108. Pace CN, Vajdos F, Fee L, Grimsley G, Gray T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci*. 1995. **4**: 2411-2423.
109. Segrest JP, Jones MK, De Loof H, Brouillette CG, Venkatachalapathi YV, Anantharamaiah GM. The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function. *J Lipid Res*. 1992. **33**: 141-166.

110. Wilson C, Wardell MR, Weisgraber KH, Mahley RW, Agard DA. Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of human apolipoprotein E. *Science*. 1991. **252**: 1817-22.
111. Wood J, Sharma R. How Long is the long-range hydrophobic attraction?. *Langmuir*. 1995. **11**: 4797-4802.
112. Wood J, Sharma R. Preparation of a robust hydrophobic monolayer on mica. *Langmuir*. 1994. **10**: 2307-2310.

***RESULTADOS I***

### **Predicción de regiones hélice $\alpha$ de las apolipoproteínas AII, CIII, E3 y AI**

Debido a que no existe homología alguna entre las diversas apolipoproteínas intercambiables humanas a nivel de estructura primaria, resulta muy interesante hacer un análisis a nivel de estructura secundaria con la finalidad de buscar posibles dominios consenso de hélice  $\alpha$ . Dichos dominios consenso que muestran las diversas apolipoproteínas, pudieran estar involucrados en los mecanismos de reconocimiento y transferencia de lípidos. Con base en las secuencias primarias de las apolipoproteínas intercambiables (AI, AII, CIII y E3), éstas se sometieron a análisis de estructura secundaria con diversos algoritmos de predicción. Es interesante observar cómo los análisis teóricos de los diferentes métodos de predicción de estructura secundaria, muestran diferentes regiones hélice  $\alpha$  a lo largo de las cadenas polipeptídicas de las diferentes apolipoproteínas. En esta tesis, se muestran los resultados obtenidos mediante el método de predicción de estructura secundaria de PHD HeiDelberg (PHD versión 5.94-317), observándose diferentes regiones helicoidales para las diferentes apolipoproteínas. En la figura 6 se muestran los ejemplos de predicción de estructura secundaria de las apolipoproteínas AII, CIII, AI y E3 con sus diferentes regiones de predicción hélice  $\alpha$ . Es importante mencionar que únicamente se hizo el análisis de predicción de estructura secundaria de la región carboxilo terminal 192-299 de la apo E3, debido a que la estructura tridimensional de la región amino terminal 1-191 ya ha sido resuelta cristalográficamente (Wilson y col., 1991). En cada una de las regiones hélice  $\alpha$  se observa la presencia de varios residuos de amino ácidos hidrofóbicos que se agrupan en una dirección y relacionados directamente con valores altos de  $\mu\text{H}$  sugiriendo la presencia de hélice  $\alpha$  anfipáticas.

#### **Apo AII**

```

          10           20           30           40           50
QAKEPCVE SLV SQYF QT VTDYGKDLMEKVKSP ELQ AEA KSY FE KSKEQLT P
LL LL ·LHHHHHHHHHHHHHHHH ·HHHHH · ·LLHHHHHHHHHHHHHHHHHH ·H·H

          60           70
L I KKAGTE LVNF L SY F VELGTQPATQ
HHHHH ·HHHHHHHHHHH · · · LLLLL LL
```



**Apo CIII**

10 20 30 40 50  
SEAEDASL LS FMQGYMKHATKT AKDALS SV QE SQVAQQARGWVTDGF S S L  
LLLLL · HHHHHHHHHHHH HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH · · · · H H HHH

60 70  
KDYWSTVKDKFSEFWDLDPVRPTSAVAA  
HHHHHHH · · · · · LLLLLLL LLLL LL

**Apo E3 (192-299)**

192 200 210 220 230 240  
AATVGSLAGQPLQE RAQAWGER LRARMEEMGSRT RDRL DEVKEQV AEVRAK  
HH · · · HH · L L · · HHHHHH HHHHHHHHHHHH · HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH

250 260 270 280 290  
LE EQ AQQI RLQ AEAQAR LKSWFE PLVEDMQRQWAGLVEKV QAAVGTSAAP  
HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH · · HHHHHHHHHHHH HHHHHHHHHHHH · · LLLL

299  
VPSDNH  
LL LL LL

**Apo AI**

10 20 30 40 50  
DEPPQSPWDRV KDLATVYVDV LKDSGRDYV SQF EGS ALGKQLN LKLLDNWD  
LLLLL L · · HHHHHHHHHHHHHHHHH H · · HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH · · · ·

60 70 80 90 100  
SVT ST F S KLREQLGPVTQEFWDNLE KET EGLRQ EMSKDLE EVKAKVQPYL D  
HHHHHHHHHHHHHH · LL · · H HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH

110 120 130 140 150  
DFQKKWQEEME LYRQKVE PLR AELQEG ARQKL HELQE KL SP LG EEMRDRA  
HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH · H HHHHHHHHHH

160                      170                      180                      190                      200  
 RAHV DALRTHLAPYSDE LRQR LAARL EALKENGGARLAE YH AKATEHLST L  
 HHHHHHHHHHHH · · · · HHHHHHHHHHHHHHHHH · L LL L · HHHHHHHHHHHHHHHH  
  
 220                      230                      240  
 S EK AK PAL EDLRGE LL PV LE SF KVSF L SALEE YT KKLNT Q  
 HHH · · HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH · · LL

**Figura 6.** Predicción de estructura secundaria de la apo AII, apo CIII, apo E3 (Carboxilo terminal) y apo AI de acuerdo al método de PHD (HeiDelberg). H= hélice  $\alpha$ , L= estructura al azar y •= residuos de aminoácidos sin predecir.

***Regiones hélice  $\alpha$  anfipáticas***

A partir de los resultados obtenidos de los análisis de estructura secundaria, se calcularon los valores de  $\mu H$  para cada una de las regiones hélice  $\alpha$  de las apolipoproteínas AII, CIII, E3 y AI de acuerdo en la ecuación 1. Los valores obtenidos de  $\mu H$  para los tres motivos hélice  $\alpha$  presentes en la región carboxilo terminal de la apo E3, corresponden a hélice  $\alpha$  anfipáticas (Tabla 1). La apo AII contiene dos hélice  $\alpha$  con valores de  $\mu H$  mayores a 0.2 kcal/mol por residuo (Tabla 1). Las apolipoproteínas CIII y AI muestran hélice  $\alpha$  de tipo anfipática, con valores ligeramente por arriba a 0.2 kcal/mol por residuo (Tabla 1). Sin embargo, la apo AI en su región helicoidal 168-182 presenta un valor de  $\mu H$  de 0.18 kcal/mol por residuo, por lo que no es considerada como una hélice  $\alpha$  de tipo anfipática (Tabla 1). Independientemente de la existencia de regiones hélice  $\alpha$  con valores menores de 0.2 kcal/mol por residuo, se ha demostrado que no sólo la contribución de una región anfipática que interacciona directamente con los lípidos debe ser considerada, pues al parecer existe una cooperatividad entre múltiples regiones hélice  $\alpha$  (Scanu y Tardieu, 1971; Anantharamaiah col., 1985; Castro y Fielding, 1988; Brasseur y col., 1991). Así mismo, cada una de las regiones estructuradas como hélice  $\alpha$  en una proteína, genera un valor de momento dipolar que contribuye al momento dipolar total de la proteína (Lockhart y Kim 1992; Hol y col.,

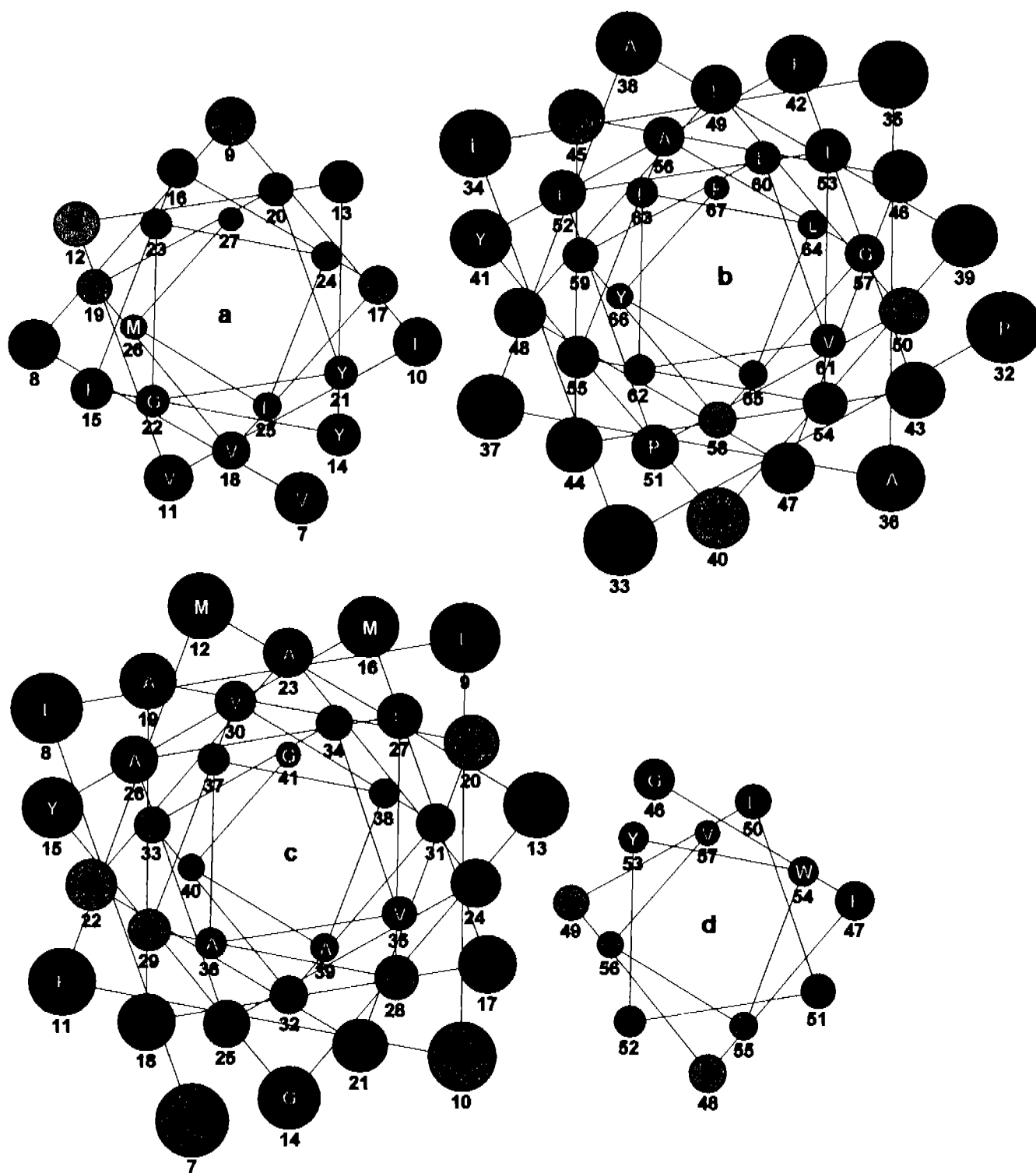
1978). De modo análogo, los valores de  $\mu H$  en una hélice  $\alpha$  contribuyen al momento hidrofóbico promedio ( $\mu H_{prom}$ ) de una proteína (Bolaños-García y col., 1997). Con base en la ecuación 2 se calcularon los valores de  $\mu H_{prom}$  para las apolipoproteínas AII, CIII, E3 y AI mostrando valores mayores a 0.2 kcal/mol por residuo, y sugiriendo que sean consideradas para formar hélice  $\alpha$  anfipáticas. Por lo tanto, el  $\mu H_{prom}$  para cada una de las apolipoproteínas muestra valores de 0.415, 0.320, 0.306 y 0.272 kcal/mol por residuo, respectivamente. La distribución asimétrica de los residuos de aminoácidos y los valores de  $\mu H_{prom}$  por arriba de 0.2 kcal/mol por residuo, son características importantes de hélice  $\alpha$  anfipáticas los cuales nos indican la capacidad de interacción de estas proteínas con diversos tipos de lípidos.

### ***Giros helicoidales***

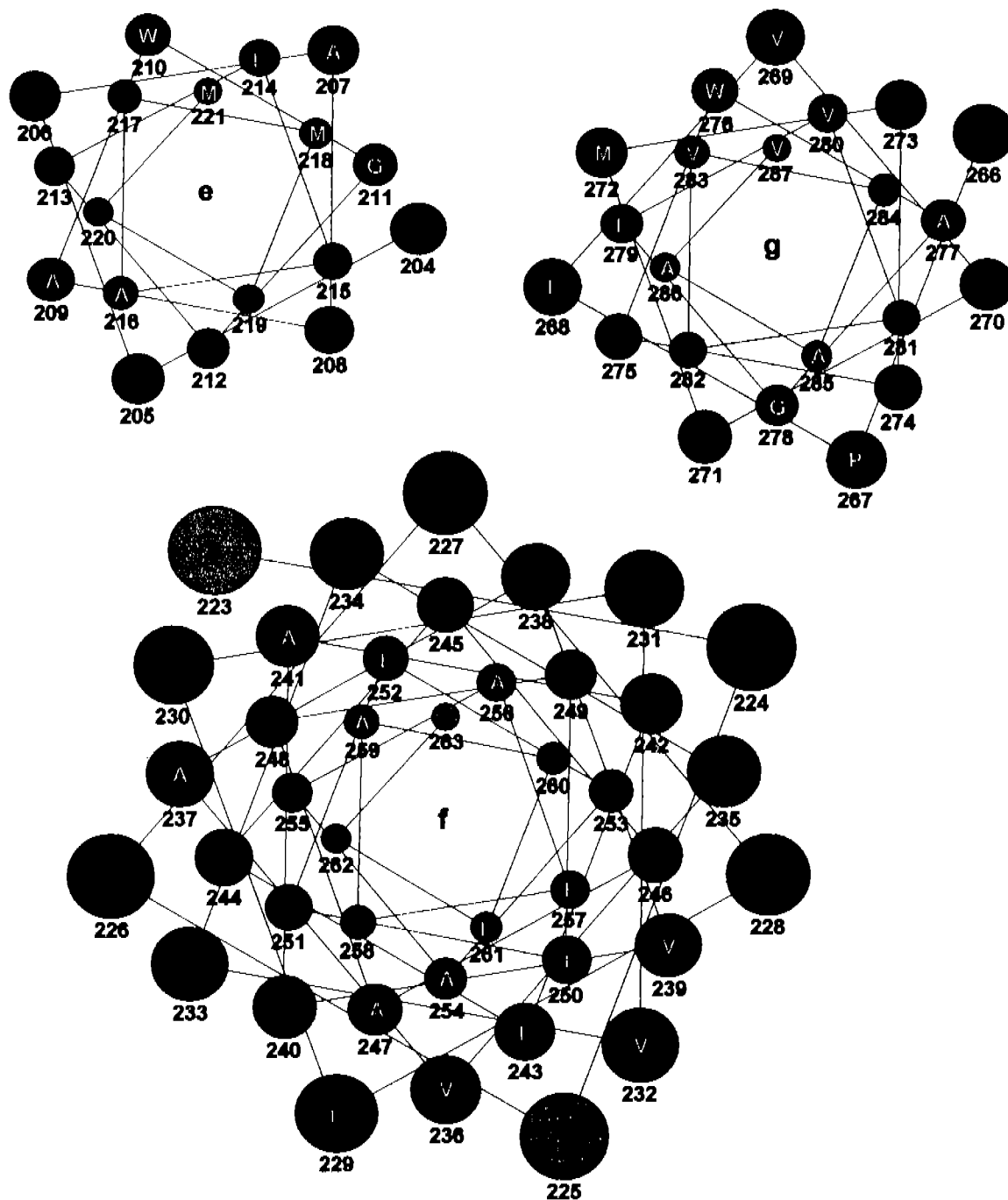
Con base en los análisis de predicción de estructura secundaria y de los análisis de  $\mu H$  de las diferentes regiones hélice  $\alpha$  anfipática de las diversas apolipoproteínas intercambiables (AII, AI, CIII y E3), éstas fueron representadas en forma de giros helicoidales "*Helical Wheel*" utilizando el programa PROTEAN del DNASTAR (Figura 7A, B, y C). En las diferentes representaciones helicoidales se observa como los residuos de aminoácidos hidrofóbicos se orientan en una dirección a lo largo del eje de la hélice  $\alpha$ . Las hélice  $\alpha$  anfipáticas con valores de  $\mu H$  por arriba de 0.2 kcal/mol por residuo presentan un mayor agrupamiento de residuos de aminoácidos hidrofóbicos en una dirección, mientras que las hélice  $\alpha$  con valores por debajo de 0.2 kcal/mol por residuo presentan una mezcla de residuos de aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos (Figura 7A, B, y C). La distribución asimétrica que guardan los residuos de aminoácidos hidrofóbicos y los valores altos de  $\mu H$ , es un prerrequisito en la formación de hélice  $\alpha$  anfipáticas (Bolaños y col., 1997; Segrest y col., 1992).

Proteína	Número de aminoácidos	Masa molecular (Da)	Segmentos helicoidales	Valor de $\mu H$ (kcal/mol)
Apo CI	57	6 630	4-30	0.54
			35-53	0.36
			7-27	0.49
Apo AII	77	8 708	32-67	0.34
Apo CIII	79	8 760	7-41	0.21
			46-57	0.43
Apo E3 (192-299)	299	34 200	204-221	0.28
			223-263	0.22
			266-287	0.42
Apo AI	243	28 300	9-47	0.28
			52-63	0.35
			69-163	0.27
			168-182	0.18
			189-240	0.28

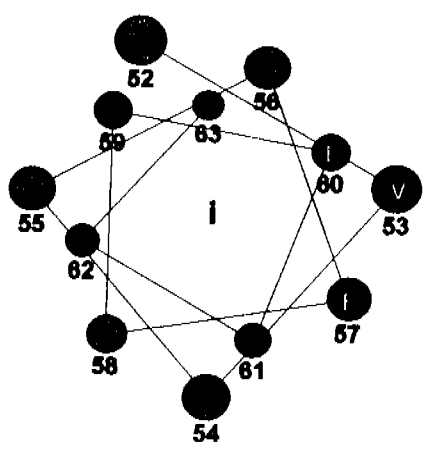
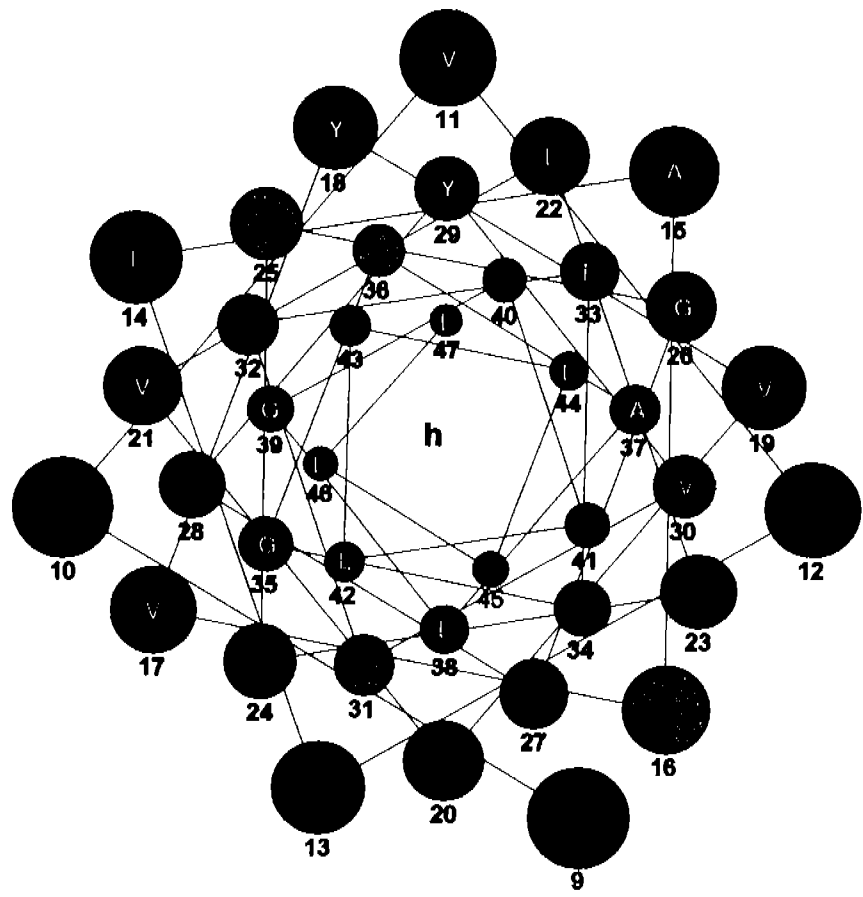
**Tabla 1.** Valores de  $\mu H$  para las diferentes regiones hélice  $\alpha$  anfipáticas de las apolipoproteínas intercambiables humanas AII, CIII, AI y E3.

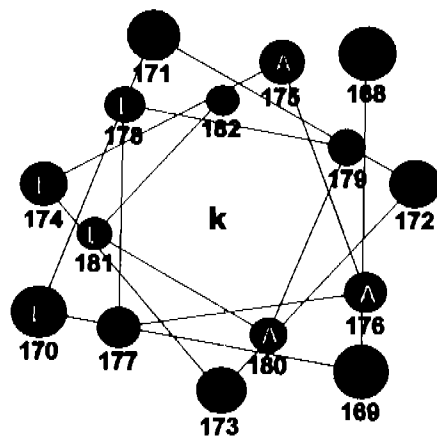
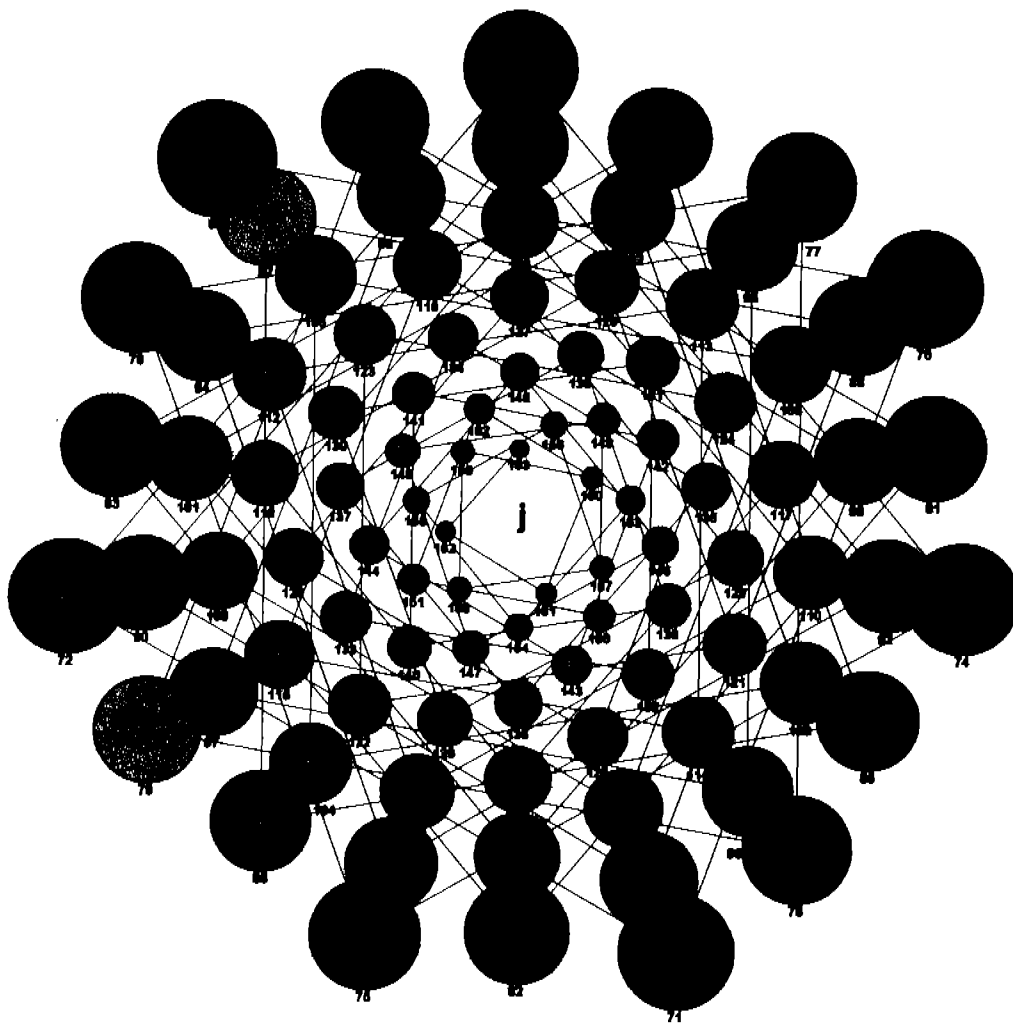


**Figura 7A.** Proyección de giros helicoidales de hélice  $\alpha$  anfipáticas presentes en la apo All (a y b), apo CIII (c y d). Los residuos de aminoácidos hidrofóbicos están marcados en color negro.

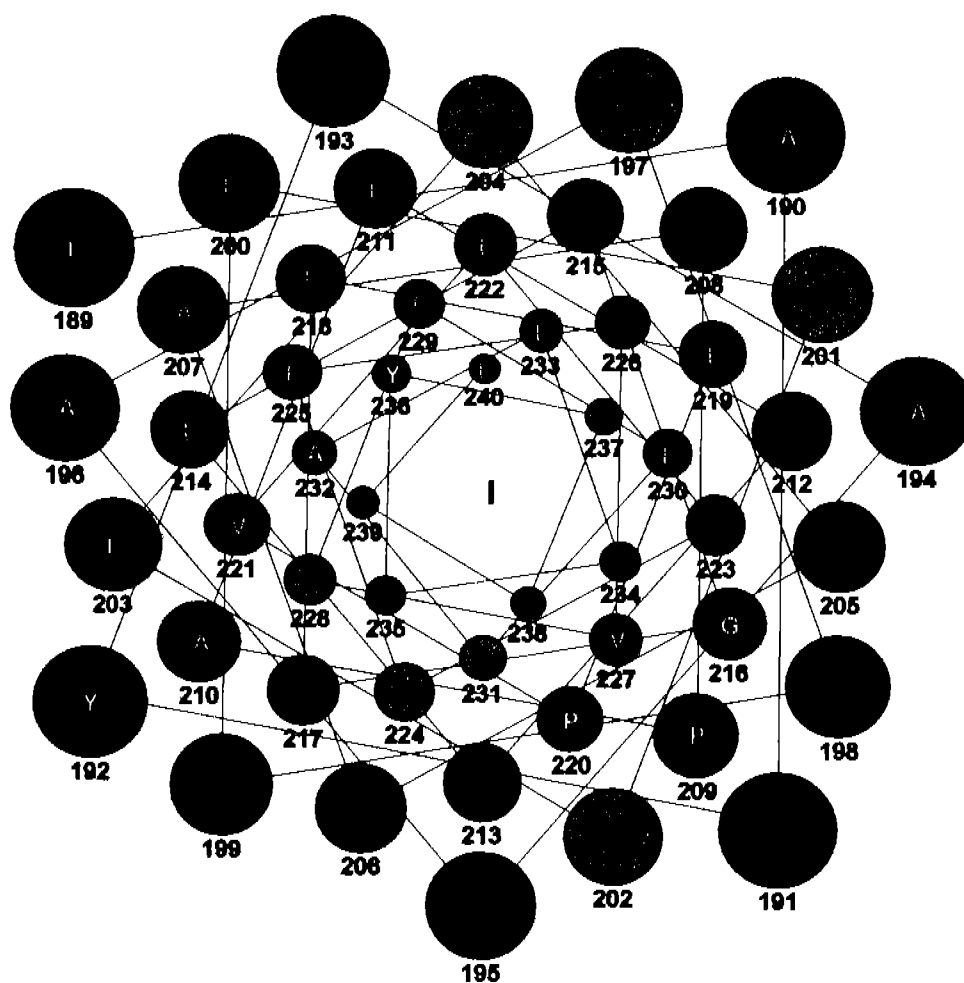


**Figura 7B.** Proyección de giros helicoidales de hélice  $\alpha$  anfipáticas presentes en la apo E3 (e-g). Los residuos de aminoácidos hidrofóbicos están marcados en color negro.









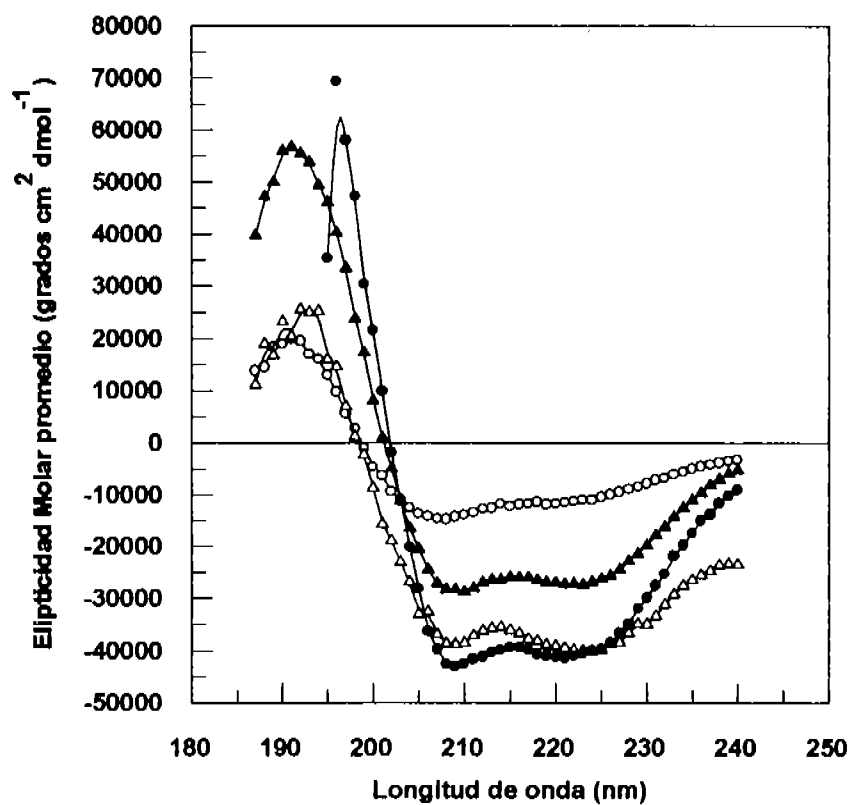
**Figura 7C.** Proyección de giros helicoidales de hélice  $\alpha$  anfipáticas presentes en la apo Al (h-I). Los residuos de aminoácidos hidrofóbicos están marcados en color negro.

### **Estimación del contenido de estructura secundaria de las diferentes apolipoproteínas**

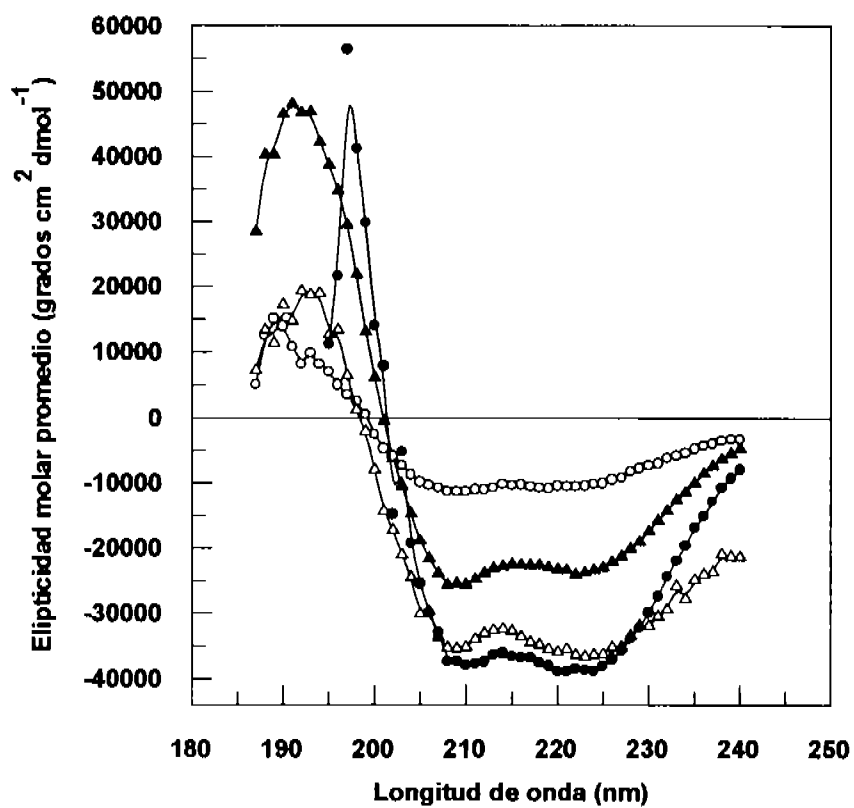
Los espectros de dicroísmo circular para las apolipoproteínas AII, CIII, AI y E3 muestran las características típicas del equilibrio entre las transiciones "hélice-coiled coil" bajo condiciones optimas experimentales para la formación de una hélice  $\alpha$ . Es decir, a lo largo de los perfiles espectropolarimétricos se observan dos valores mínimos, el primero alrededor de 222 nm que corresponde a una transición hélice  $\alpha$  de tipo  $n-\pi$  y el segundo a 208 nm que corresponde a una transición hélice  $\alpha$  de tipo  $\pi-\pi^*$  y "random coil" de tipo  $\pi-\pi^*$ . En todos los casos, la elipticidad molar promedio a 222 nm ( $[\theta]_{222}$ ) fue independiente de la concentración de proteína entre un rango de 0.1-0.2 mg/ml.

La figura 8 muestra los espectros de dicroísmo circular de las diferentes apolipoproteínas intercambiables dispersadas en una solución de fosfatos (20 mM, pH 8.0) en 20°C, mostrando las dos transiciones mínimas a 208 y 222 nm. La figura 9 muestra los espectros de dicroísmo circular de las diferentes apolipoproteínas intercambiables dispersadas en una solución de fosfatos (20 mM, pH 8.0) a 20°C en presencia de 3.5 M KCl. Independientemente de que el sistema sea estudiado a una alta fuerza iónica, los espectros de dicroísmo circular no muestran una pérdida considerable en los contenidos de estructura secundaria hélice  $\alpha$ , como puede observarse en las transiciones mínimas a 208 y 222 nm. Básicamente, las apolipoproteínas intercambiables (AII, AI, CIII y E3) mantienen muy bien su integridad estructural y su carácter anfipático sugiriendo una alta estabilidad en presencia de 3.5 M de KCl (Figuras 8 y 9). La integridad que guardan las apolipoproteínas es importante para el desarrollo de monocapas de Langmuir en la interfase de aire/agua de una subfase altamente concentrada de KCl.

De manera interesante, el KCl a concentraciones de 3.5 M muestra una gran densidad que favorece que las apolipoproteínas se difundan y se orienten rápidamente hacia la interfase aire/agua para formar monocapas de Langmuir. Así mismo, las monocapas de algunas apolipoproteínas intercambiables son estables, cuando son comprimidas lateralmente altas presiones laterales.



**Figura 8.** Estimación del contenido de estructura secundaria de la apo AII (●), apo CIII (○), apo AI (▲) y E3 (△) a 20°C. Las apolipoproteínas se resuspendieron en una solución de fosfatos 20 mM, pH 8.0.

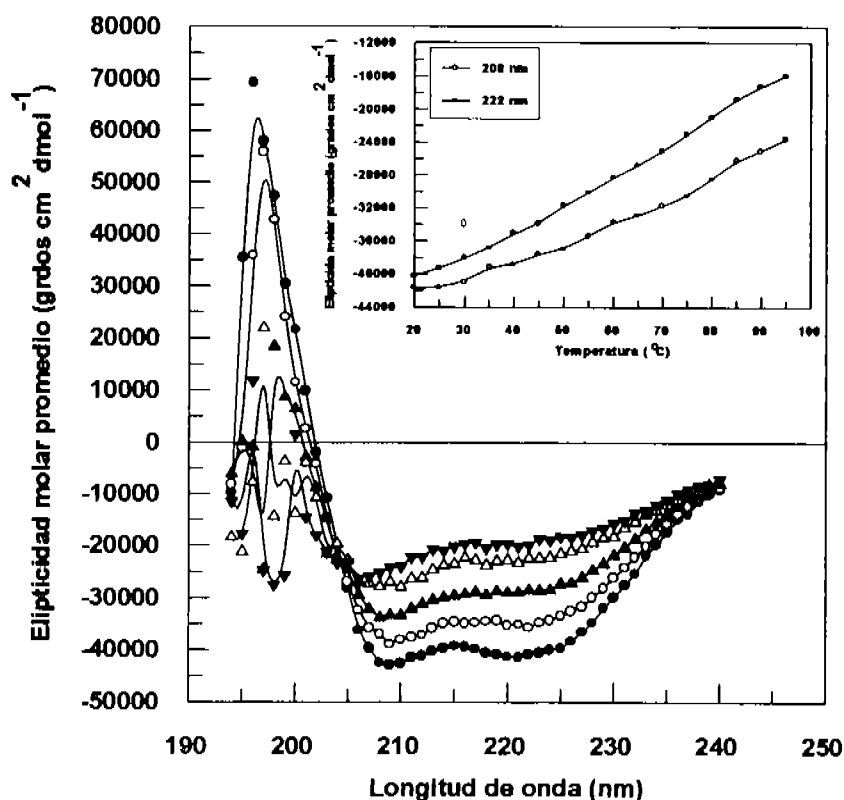


**Figura 9.** Efecto de la concentración de KCl (3.5 M) sobre el contenido de estructura secundaria hélice  $\alpha$  de la apo AII (●), apo CIII (○), apo AI (▲) y E3 (△) a 20°C, pH 8.0.

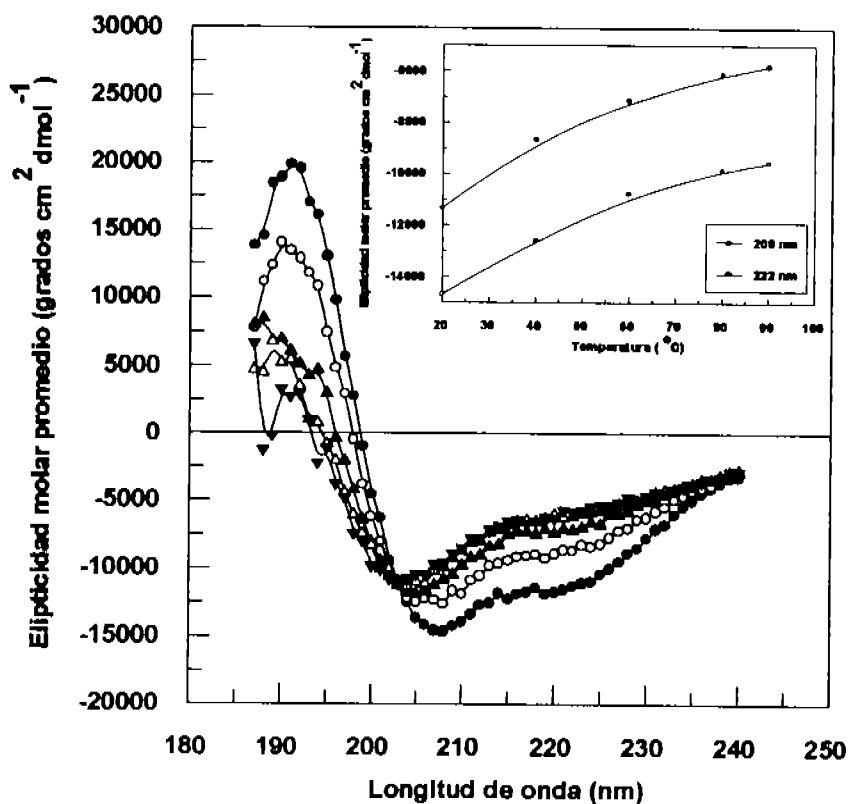
Resulta de gran interés realizar estudios de estabilidad de las apolipoproteínas, AII, CIII, AI, y E3 mediante dicroísmo circular, con la finalidad de evaluar los porcentajes de estructura secundaria hélice  $\alpha$  cuando son sometidas a altas temperaturas. Los diferentes espectros de dicroísmo circular muestran como las diferentes apolipoproteínas intercambiables pierden parte del contenido de estructura secundaria hélice  $\alpha$  y como reorganizan su conformación al 100 %, conservando su carácter anfipático como función de la temperatura. Las figuras 10-13 muestran los espectros de dicroísmo circular para las diferentes apolipoproteínas intercambiables a diferentes temperaturas. En cada uno de los espectros se puede observar pérdidas considerables de estructura secundaria; sin embargo las apolipoproteínas no son desnaturalizadas, es decir, conservan parte del contenido de su estructura secundaria hélice  $\alpha$ . Las curvas de desdoblamiento y plegamiento son prácticamente las mismas sobreponiéndose completamente, sugiriendo que en ambos procesos los estados intermedarios pasan por las mismas rutas. Durante los procesos de desdoblamiento y plegamiento por calor en cada apolipoproteína, se observa la presencia de un punto isodicroico muy bien definido en un rango de 204-205 nm. En cada caso, la presencia de un punto isodicroico sugiere fuertemente un carácter de dos estados intermedarios, mostrando que la integridad de la estructura hélice  $\alpha$  anfipática es dependiente de la temperatura y que su estabilización es conducida por la entalpía.

Los espectros de dicroísmo circular a 208 y 222 nm para las apolipoproteínas AII y CIII, muestran dos estados de transición o estados intermedarios, durante el desdoblamiento de ambas proteínas por calor (Figura 10 y 11). En los insertos de estas figuras se observan las curvas de desdoblamiento por calor a 208 y 222 nm mostrando los diferentes estados intermedarios y sugiriendo una baja cooperatividad. Sin embargo, en los espectros de la apo AI sólo se observa un estado de transición a 208 y 222 nm (Figura 12). El inserto de esta figura muestra los trazos a 208 nm y 222 nm durante el desdoblamiento por calor, observándose una curva de tipo sigmoidal y sugiriendo una alta cooperatividad. De acuerdo con los resultados obtenidos durante el proceso de desdoblamiento por calor de la apo E3, no se define claramente si son dos o tres estados de transición (Figura 13). Sin embargo, estudios previos de estabilidad de la apo E3 bajo condiciones de desnaturalización por calor, han propuesto la existencia de dos dominios estructurales y la presencia de estados intermedarios estables (Wetterau

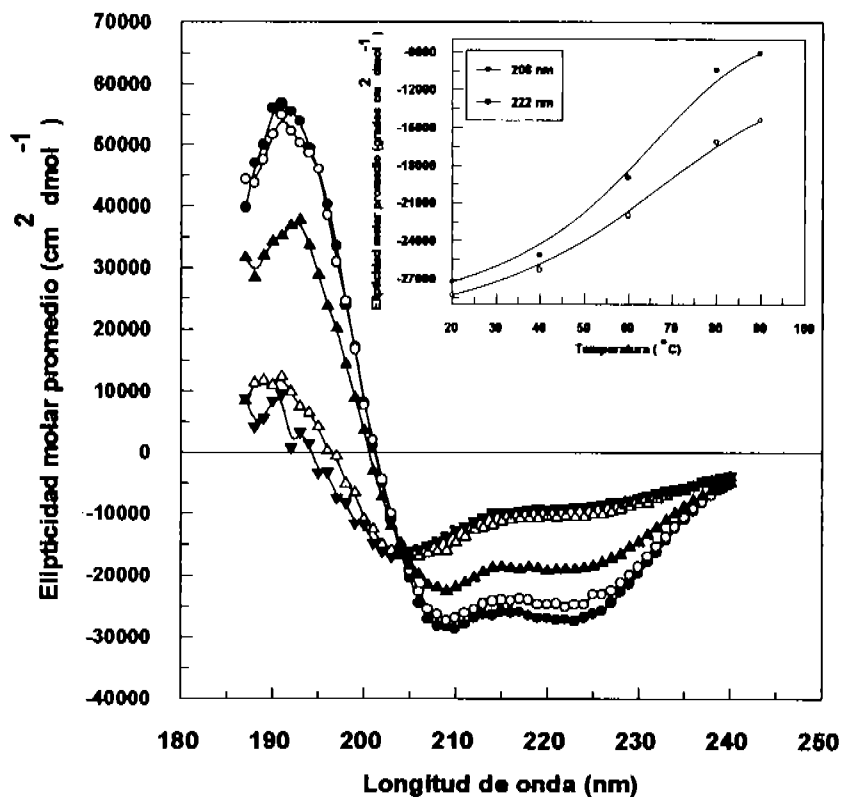
y col., 1988). El inserto muestra una curva de tipo sigmoïdal, demostrando la presencia de un alta cooperatividad a 208 y 222 nm durante el desdoblamiento por calor de la proteïna.



**Figura 10.** Evaluación del contenido de estructura secundaria hélice  $\alpha$  de la apo AII como una función de la temperatura, a pH 8.0. Los perfiles espectropolarimétricos muestran las curvas a temperaturas de 20 (●), 40 (○), 60 (▲), 80 (△) y 90°C (▼). En el inserto se observan las curvas de desnaturalización a 208 y 222.

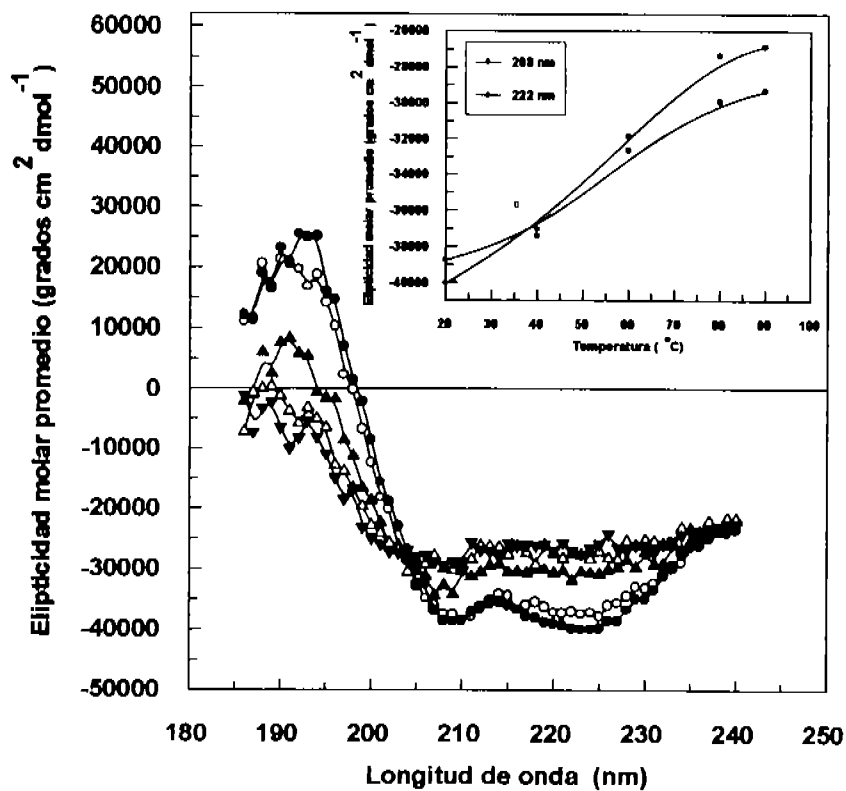


**Figura 11.** Evaluación del contenido de estructura secundaria hélice  $\alpha$  de la apo CIII como una función de la temperatura, a pH 8.0. Los perfiles espectropolarimétricos muestran las curvas a temperaturas de 20 (●), 40 (○), 60 (▲), 80 (△) y 90°C (▼). En el inserto se observan las curvas de desnaturalización a 208 y 222.



**Figura 12.** Evaluación del contenido de estructura secundaria hélice  $\alpha$  de la apo AI como una función de la temperatura, a pH 8.0. Los perfiles espectropolarimétricos muestran las curvas a temperaturas de 20 ( $\bullet$ ), 40 ( $\circ$ ), 60 ( $\blacktriangle$ ), 80 ( $\triangle$ ) y 90°C ( $\blacktriangledown$ ). En el inserto se observan las curvas sigmoideas a 208 y 222.





**Figura 13.** Evaluación del contenido de estructura secundaria hélice  $\alpha$  de la apo E3 como una función de la temperatura, a pH 8.0. Los perfiles espectropolarimétricos muestran las curvas a temperaturas de 20 ( $\bullet$ ), 40 ( $\circ$ ), 60 ( $\blacktriangle$ ), 80 ( $\triangle$ ) y 90°C ( $\blacktriangledown$ ). En el inserto se observan las curvas sigmoideas a 208 y 222.

### ***Monocapas de Langmuir de las apolipoproteínas intercambiables humanas***

Vale la pena resaltar en esta sección de resultados, que se hicieron varios experimentos de monocapas de Langmuir para las diferentes apolipoproteínas intercambiables, obteniendo isothermas con las mismas características. Sin embargo, únicamente se muestra una isoterma típica a 25 °C para cada una de las apolipoproteínas, que a continuación se describen.

**Apolipoproteína AII.** Esta proteína presenta la capacidad de orientarse en una interfase aire/agua para formar monocapas de Langmuir, cuando se dispersa en una solución de fosfatos 20 mM, pH 8.0 y con 3.5 M de KCl. Durante la compresión lateral de la monocapa se presentan incrementos en la presión lateral, observándose cambios de organización en la monocapa conocidos como transiciones de fase. Estas transiciones de fase se pueden observar en isothermas típicas de área *versus* presión lateral y en imágenes de MAB (Figura 14). La isoterma de la apo AII muestra varias características: a) Después de dispersar a la proteína en la subfase se forma una monocapa presentando propiedades de una fase gaseosa (G), donde no existen interacciones intermoleculares e intramoleculares. Las imágenes de MAB muestran a monocapas con texturas que no presentan contraste y únicamente se observan superficies de color gris sin definir claramente a la fase gaseosa. b) Con un incremento en la presión lateral se presenta una primera transición de fase de un estado gas a un estado líquido expandido (L), comenzando aproximadamente con una área inicial de  $5000 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ . Durante la formación de la coexistencia G/L no fue posible observar claramente los dominios de la fase líquido expandido y los dominios de la fase gaseosa. Durante esta transición de fase se observan cambios continuos de reflectividad y como la fase G de la monocapa se organiza en una fase mas sólida para formar la fase L. c) Con una presión lateral mayor justo después de la transición de fase G/L, se presenta una fase L típica de baja compresibilidad (inserto a de la figura 14). No obstante, las observaciones que se realizaron con MAB no ayudaron a confirmar claramente algún dominio de la fase L debido a la baja capacidad de resolución del equipo. Sin embargo, defectos en la monocapa que cambian a una velocidad lenta y son similares a los que se encuentran en la coexistencia G/L, revelan las diferentes viscosidades de ambas fases. c) La pendiente de la isoterma de la apo AII presenta un cambio poco significativo a una presión lateral de  $\sim 22 \text{ mN/m}$  y las imágenes de MAB no ayudaron a

confirmar si este cambio corresponde a una transición de fase. d) Con un incremento mayor en la presión lateral a una  $\Pi \sim 30-35 \text{ mN/m}$  y una  $a \sim 1000-2500 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ , se observa una segunda transición de fase típica entre dos fases condensadas  $L/LC$ . Los dominios que presentan una textura de color oscuro de bajo contraste corresponden a la fase  $L$  y los dominios que presentan una textura de gran brillantez con alto contraste corresponden a la fase  $LC$ . Las observaciones realizadas con MAB revelan que durante la compresión lateral de la monocapa, la fase  $L$  comienza a nuclearse para formar a una fase  $LC$  de gran brillantez cubriendo a toda el área de la monocapa (inserto b de la figura 14). Los dominios de la fase de  $L$  presentan una fluidez que cambia a dominios sólidos y brillantes conforme incrementa la presión lateral. Los ciclos de compresión-expansión de la monocapa durante la transición de fase  $L/LC$ , conservan los mismos patrones de organización: una fase  $L$  y una fase  $LC$ . Las observaciones realizadas con MAB durante la transición de fase  $L/LC$  indican como la fase  $LC$  se forma a partir de la fase  $L$  e indicando una transición de fase de primer orden y sugiriendo una monocapa estable. e).- Al final de la compresión lateral de la monocapa de la apo AII a una  $\Pi \sim 47 \text{ mN/m}$  y una  $a \sim 500 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ , se observan defectos que se asemejan a un colapso típico posiblemente asociada a la formación de multicapas.

Los ciclos de compresión-expansión a lo largo de toda la monocapa de la apo AII muestran isotermas con características idénticas, presentando las mismas transiciones de fase de primer orden y una pérdida importante de área en las isotermas. Sin embargo, se observó con MAB que después de varios ciclos de compresión-expansión, la monocapa presenta una textura con muchos defectos. El comportamiento que guarda la monocapa de la apo AII durante la compresión lateral es similar a lo que se observó con la apo CI presentando las mismas transiciones de fase,  $G/L$  y  $L/LC$  así como también cambios de área en la pendiente de la isoterma (Bolaños y col., 1999).

De manera paralela se obtuvieron isotermas de la monocapa de la apo AII a pH 8.0 y pH 7.0, presentando las mismas características: una transición de fase  $G/L$  a una presión lateral de  $\Pi \sim 0 \text{ mN/m}$ , una transición de fase  $L/LC$  a una  $\Pi \sim 30-35 \text{ mN/m}$  y un colapso típico a altas presiones laterales. Las imágenes de MAB ayudaron a confirmar la presencia de las diferentes fases durante la compresión lateral de la monocapa. Así mismo, la estabilidad de la monocapa de la proteína se determinó manteniéndola durante la interfase aire/agua a una presión lateral de  $\Pi \sim 30 \text{ mN/m}$  durante una hora,

perdiendo únicamente 3  $mN/m$  e indicando que la monocapa es estable cuando se encuentra asociada en la superficie de una subfase de KCl.

La segunda transición de fase *L/LC* que muestra la monocapa de la apo AII, es probablemente la misma transición de fase que se observa en la monocapa de la apo CI donde una región hélice  $\alpha$  anfipática de la proteína se desprende de la interfase aire/agua para ocupar una menor área de superficie (Bolaños y col., 1999). La pérdida de área durante la transición de fase y los cambios de reflectividad muy probablemente se deben a cambios de conformación de la proteína, como una consecuencia de la compresión lateral de la monocapa al separarse de la interfase un fragmento de la apo. Las hélice  $\alpha$  desprendidas de la interfase aire/agua probablemente no guardan ninguna correlación intra o supramolecular, porque no se observan texturas diferentes en los dominios de las fases condensadas. Los segmentos hélice  $\alpha$  32-67 de la apo AII se encuentra fuera de la interfase con dirección hacia el aire mostrando un valor de momento hidrofóbico de 0.34 kcal/mol por residuo, mientras que el segmento que se encuentra sobre la interfase muestra un valor de 0.49 kcal/mol por residuo. Para todos los casos, la transición de fase *L/LC* parece indicar una transición de fase de primer orden, debido a los grandes cambios de área por molécula.

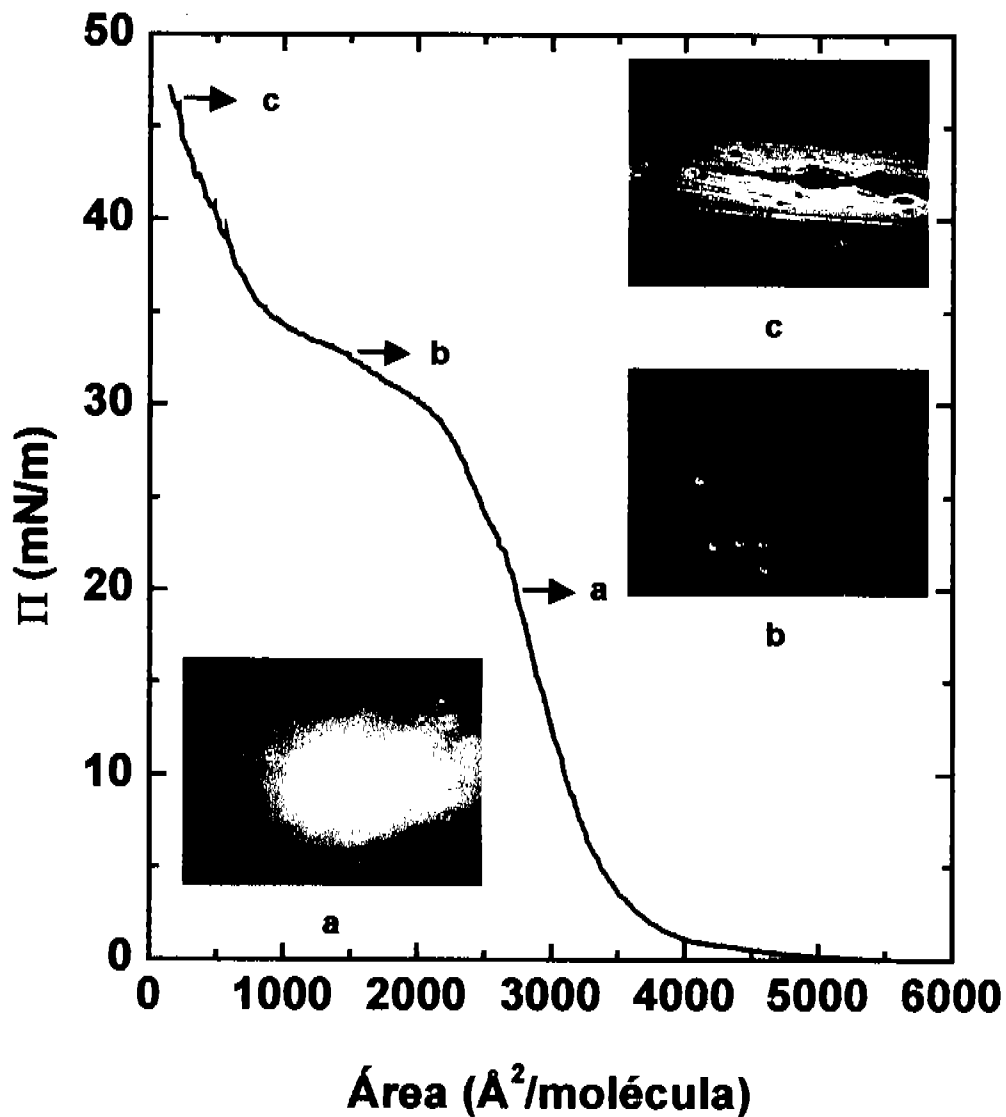
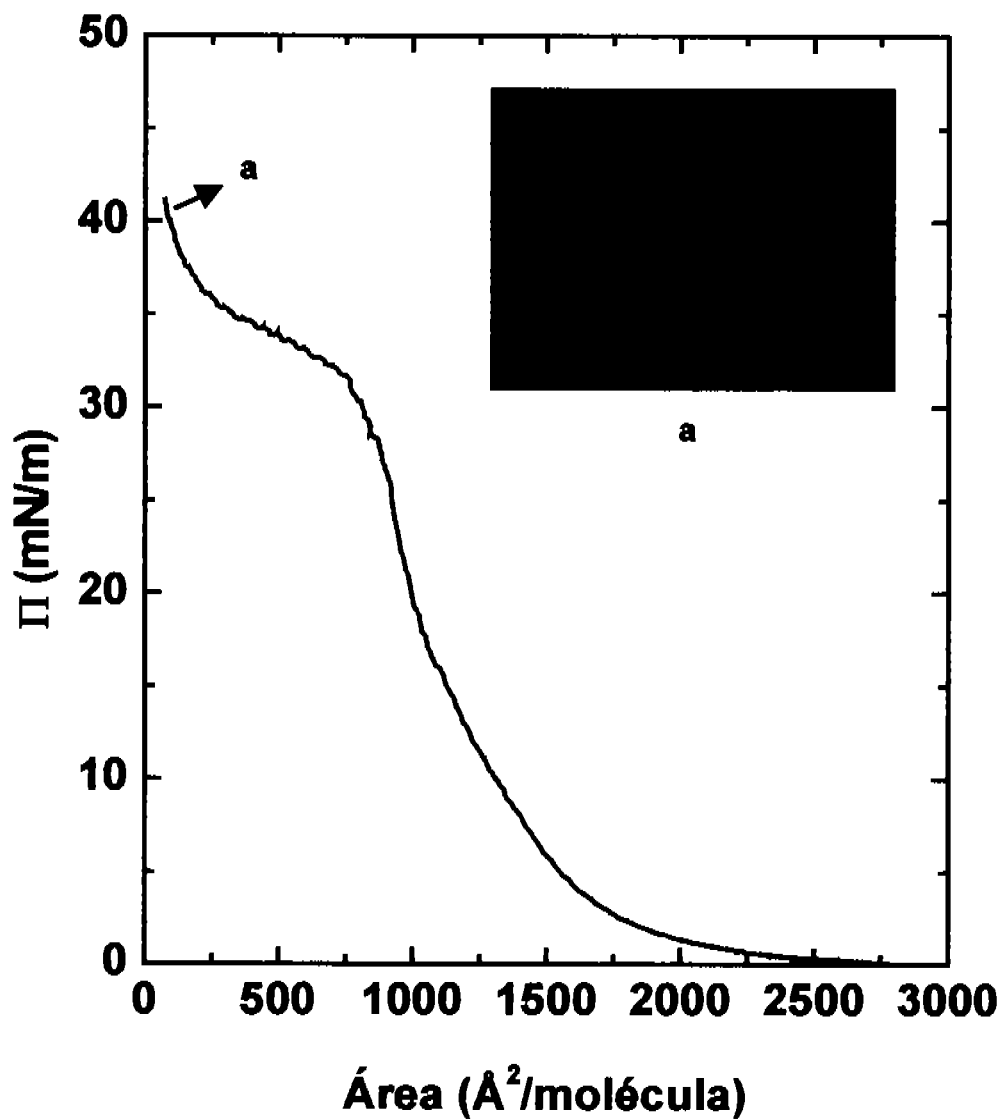


Figura 14. Isotherma típica  $\Pi$  vs  $a$  de la monocapa de la apo AII dispersada en una solución de fosfatos y 3.5 KCl (pH 8.0 y 20 mM), a 25°C. Los insertos muestran imágenes de MAB para diferentes presiones laterales.

**Apolipoproteína CIII.** Durante la compresión lateral de la monocapa de Langmuir de la apo CIII en una interfase aire/agua, se observaron varios cambios de organización, los cuales se pueden observar claramente en la isoterma típica a 25°C y pH 8.0 (Figura 15). a) Después de dispersar a la proteína en la superficie de la subfase, se forma una monocapa donde no existe interacciones intermoleculares e intramoleculares formando una fase G a áreas mayores de  $2,500 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$  y a presiones laterales de  $11-0 \text{ mN/m}$ . Con MAB no fue posible encontrar dominios de la fase G, observado únicamente a una monocapa sin contraste de color gris claro. b) Cuando la monocapa de la apo CIII es comprimida presenta una primera transición de fase G/L a una presión lateral de  $11-0 \text{ mN/m}$  y una área inicial de  $2,500 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ . Durante la coexistencia G/L, no se observan dominios de la fase L y únicamente presentan cambios continuos de reflectividad cuando la monocapa cambia de una fase G a una fase L. c) Con un incremento en la presión lateral se obtiene una fase L de baja compresibilidad y el área que presenta la pendiente de la isoterma es del orden de  $2500-750 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ . Con MAB se observan varios defectos en la textura de la monocapa, mostrando a una fase L con una mayor viscosidad que en la coexistencia G/L. c) Con un incremento mayor en la monocapa se presenta un punto de inflexión en la isoterma justo a una presión lateral de  $11-32 \text{ mN/m}$  y una área de  $750 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ , indicando la presencia de una posible transición de fase L/LC. Sin embargo, las imágenes de BAM ayudaron a confirmar la presencia del comienzo de un colapso típico y no de una transición de fase L/LC (inserto de la figura 15). Las imágenes de MAB muestran la textura de la monocapa con defectos secundarios a la formación de multicapas (inserto de la figura 15).



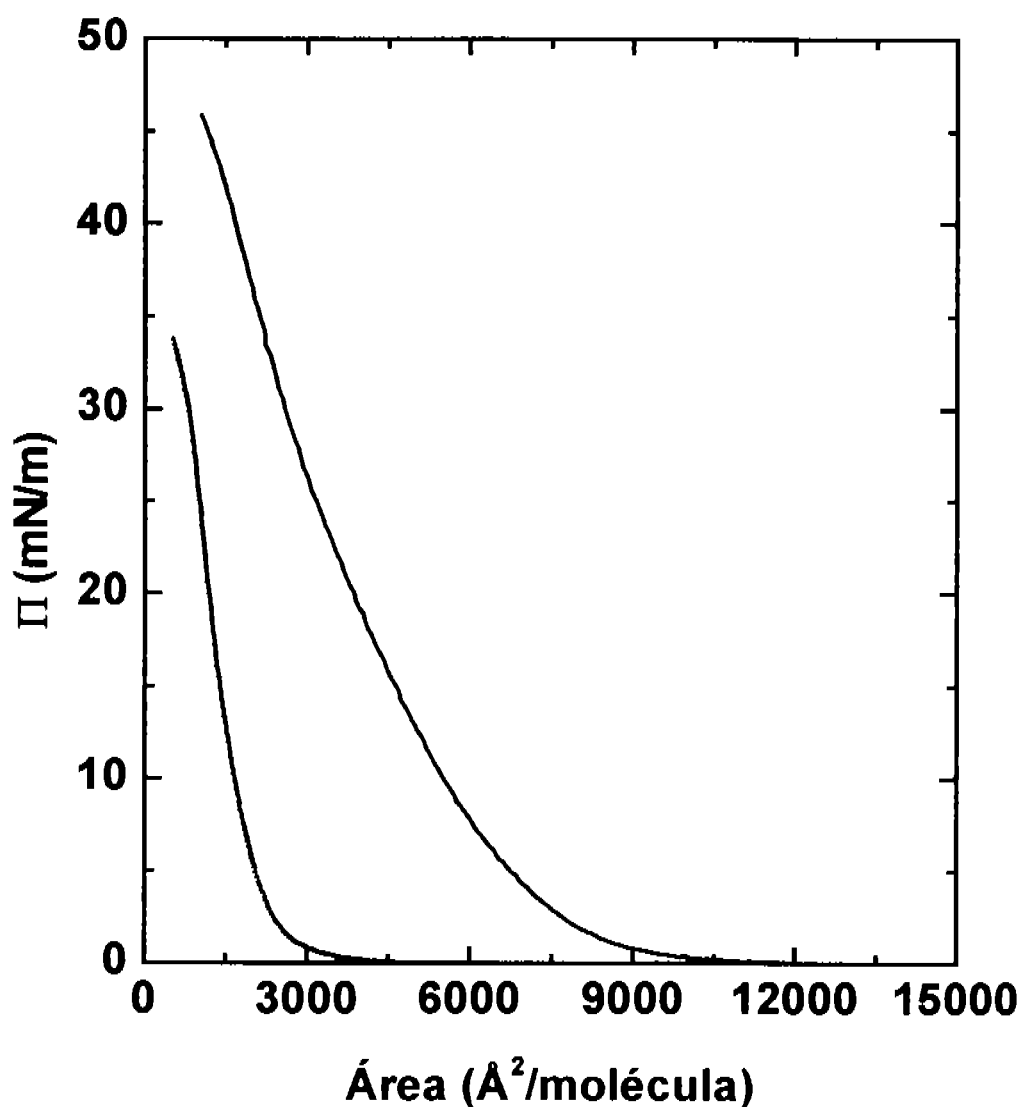
**Figura 15.** Isotherma típica  $\Pi$  vs  $a$  de la monocapa de la apo CIII dispersada en una solución de fosfatos conteniendo 3.5 KCl (pH 8.0 y 20 mM), a 25°C. El inserto muestra una imagen de BAM justo en el colapso a  $\Pi \sim 41$  mN/m y una  $a \sim 200$   $\text{\AA}^2/\text{molécula}$ .

**Apollipoproteína E3.** Para formar monocapas de Langmuir de la apo E3 se utilizaron  $3.83 \times 10^{14}$  moléculas de proteína, dispersadas sobre una subfase de 3.5 M de KCl. En la figura 16 se puede observar a una isoterma típica obtenida durante la compresión lateral de la monocapa de la apo E3 a 25°C y pH 8.0. Esta isoterma muestra las siguientes características: a).- Después de dispersar a la proteína en la subfase para formar monocapas de Langmuir a una presión lateral  $11-0 \text{ mN/m}$  y en áreas de superficies mayores de  $10, 500 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$  se encuentra en una fase G. b) Durante la compresión lateral de la monocapa se presenta una primera transición de fase G/L a una  $11-0 \text{ mN/m}$  y un área inicial de  $10, 500 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ . Durante esta transición de fase no fue posible observar dominios de la fase condensada L con MAB. No obstante, a bajas densidades de área del orden de  $100, 000 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$  se observan áreas circulares negras que corresponden a una fase gaseosa rodeada por áreas condensadas brillantes. Con un incremento aún mayor en la presión lateral, la coexistencia G/L comienza a presentar cambios continuos y tenues de reflectividad debido a la presencia de una fase más condensada. c) Conforme la presión lateral incrementa no se observa una segunda transición de fase L/LC o punto de inflexión a lo largo de toda la isoterma y las observaciones realizadas con MAB ayudaron a confirmar la ausencia de una segunda transición de fase L/LC. d) Al final de la compresión lateral de la monocapa tampoco se observa en la isoterma un colapso típico.

Para tratar de observar una segunda transición de fase y un colapso típico de la monocapa se incrementó el número de moléculas de proteína en la interfase aire/agua. El incremento del número de moléculas de apo E3 en la monocapa corresponde de  $3.83 \times 10^{14}$  a  $11.5 \times 10^{14}$ , observando únicamente una transición de fase G/L bien definida y cambiando a altas densidades de área (Figura 16). Otra posibilidad de que la apo E3 se mantenga en la superficie de la subfase es aumentando la concentración de KCl de 3.5 a 4.0 M. Sin embargo, bajo estas condiciones severas de fuerza iónica, las observaciones hechas con MAB confirmaron la ausencia de una segunda transición de fase L/LC y de un colapso típico. El comportamiento que guarda la monocapa se debe posiblemente a que la proteína se solubiliza en la subfase o bien que, debido a que su forma tridimensional no soporta altas presiones laterales y sea fácilmente expulsada de una monocapa, fenómeno observado en monocapas Gibbs. Experimentos de estabilidad muestran que la monocapa de la apo E3 con  $8.75 \times 10^{14}$  moléculas, se



mantiene estable durante 1 hora cuando se encuentra a una presión lateral de 33.7  $mN/m$ . Así mismo, los ciclos de expansión-compresión de la monocapa, muestra que las isothermas obtenidas durante la compresión lateral presentan las mismas características. Estos estudios sugieren que la apo E3 no se solubiliza en la subfase a bajas presiones laterales y por lo tanto puede organizarse en alguna dirección.



**Figura 16.** Isotherma típica  $\Pi$  vs  $a$  de la monocapa de la apo E3 a 25°C. Las curvas muestran dos cantidades de proteína  $3.8 \times 10^{14}$  (izquierda) y  $11.5 \times 10^{14}$  moléculas (derecha).

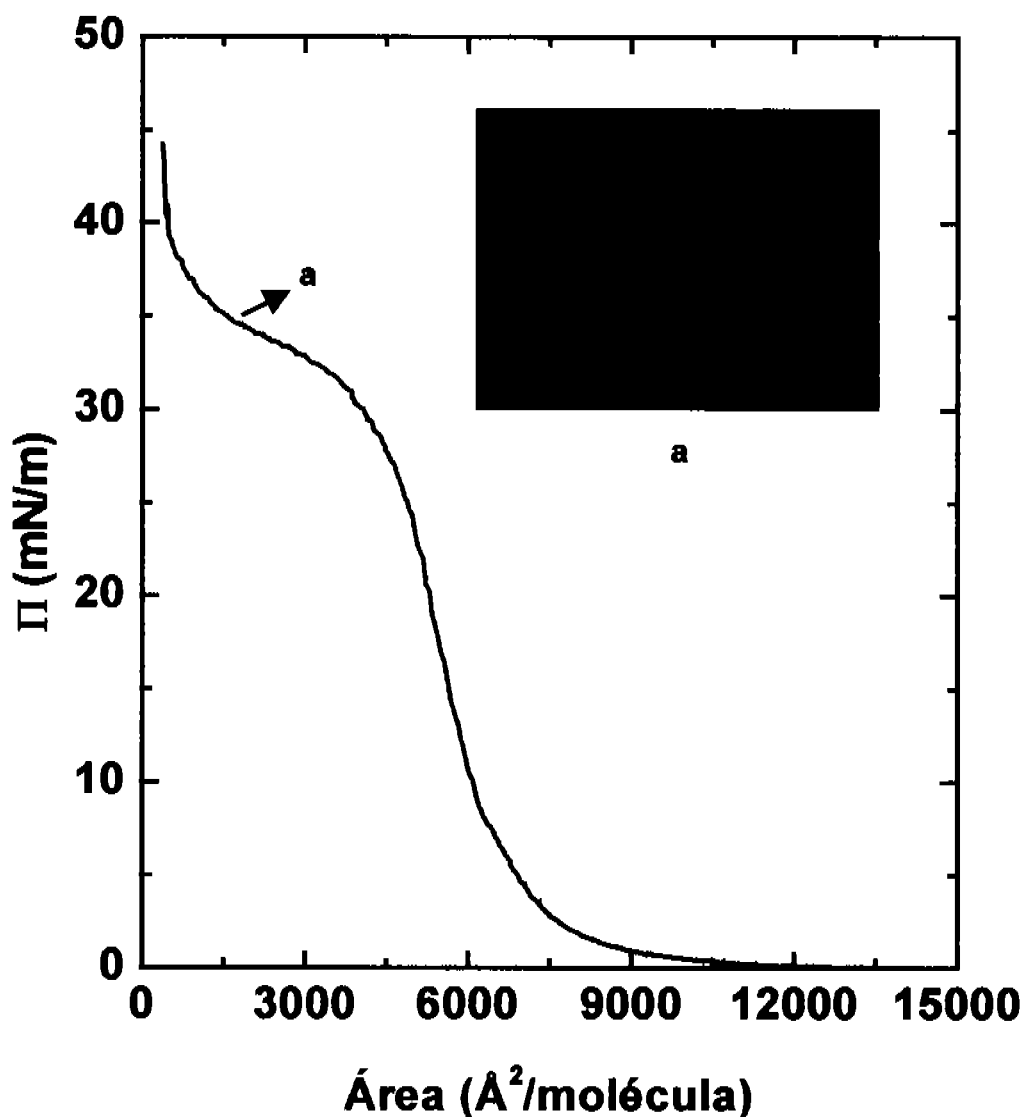
**Apolipoproteína AI.** Esta proteína al igual que las otras apolipoproteínas forman monocapas de Langmuir, cuando son dispersadas en una subfase con 3.5 M de KCl, a 25°C y pH 8.0. La isoterma que se obtiene durante la compresión lateral de la monocapa presenta las siguientes transiciones de fase: a) Una primera transición de fase comienza a una presión lateral de  $\Pi \sim 0$  mN/m y una área inicial de 12,000 Å<sup>2</sup>/molécula (Figura 17). Con MAB se observan cambios ligeros y continuos de reflectividad durante la transición de la fase G a la fase L, sin observar con más detalle la coexistencia G/L. b) Con un importante incremento en la presión lateral se observan dominios que se asemejan a la fase L, donde la viscosidad es más grande que en la coexistencia G/L y por consiguiente se observan más defectos móviles en toda la monocapa. c) Continuando con la compresión lateral de la monocapa se presenta una segunda transición de fase L/LC a una presión lateral de  $\Pi \sim 30$  mN/m y una  $a \sim 4500$  Å<sup>2</sup>/molécula, observándose un punto de inflexión en la pendiente de la isoterma (Figura 17). A esta presión lateral se presenta una pérdida considerable de área, la cual está relacionada con cambios de conformación de la apo AI. Con MAB se observa que conforme incrementa la presión lateral hasta una  $\Pi \sim 35$  mN/m, aparecen grandes dominios de gran brillantez sin ningún matiz de grises, probablemente indicando la formación de la fase LC a partir de la fase L (inserto de la figura 17). Los dominios brillantes son muy densos (sólidos), los cuales en algunos casos resulta más fácil de observar con MAB, mientras que los dominios oscuros corresponden a fase líquida L que fluye alrededor de estos dominios sólidos. Los ciclos de compresión-expansión de la monocapa durante la coexistencia L/LC a una presión lateral de  $\Pi \sim 35$  mN/m confirman la presencia de una nueva fase LC, vista como un cambio de conformación en la monocapa de la proteína y sugiriendo la posibilidad de ser una transición de fase de primer orden. c) Cuando la monocapa de la apo AI alcanza una presión lateral de  $\Pi \sim 41$  mN/m y una área de  $a \sim 500$  Å<sup>2</sup>/molécula se alcanza un colapso típico. Con MAB se observan dominios sólidos en forma de multicapas de gran brillantez, mostrando una textura con varios defectos en la monocapa (anillos de interferencia) y confirmando la presencia de un colapso típico. Experimentos de estabilidad muestran que la monocapa de la apo AI es estable cuando se mantiene por 1 hora en la interfase aire/agua, siendo idéntico a lo observado con la monocapa de la apo AII. Los ciclos de compresión-expansión a lo largo de toda el área de la monocapa, muestran isotermas

con las mismas características mostrando dos transiciones de fase *G/L* y *L/LC*. Las imágenes de MAB ayudaron a confirmar estos cambios de organización durante la compresión lateral de la monocapa.

Es importante mencionar que se realizaron experimentos con monocapas de la apo CIII en la fase *L* a una presión lateral de  $\Pi \sim 30 \mu\text{N}/\mu$  y con la monocapa de la apo AI a presiones laterales de  $\Pi \sim 29$  y  $35 \text{ mN}/\text{m}$ , mediante difracción de rayos X de incidencia rasante (Haz de luz BW1 en el Sincrotrón Hasylab). Los resultados muestran que durante la fase *L*, las monocapas de las apos CIII y AI no revelaron picos de difracción, sugiriendo que durante esta fase las monocapas de la apo CIII ( $\Pi \sim 30 \text{ mN}/\text{m}$ ) y de la apo AI ( $\Pi \sim 29 \text{ mN}/\text{m}$ ) corresponden a una fase líquida expandida sin observar orden molecular. Sin embargo, para la apo AI a una presión lateral de  $\sim 35 \text{ mN}/\text{m}$  parece indicar que la monocapa se encuentra en una fase condensada sin determinar un cambio de conformación de la proteína.

Las apolipoproteínas intercambiables CI y AII están constituidas por dos hélice  $\alpha$  muy bien definidas, las cuales se encuentran unidas por una región no estructurada. Estas proteínas pueden estar pasando a un estado de energía cercana a configuraciones mínimas trabajando como un reservorio termal cuando son depositadas en la superficie de una subfase de agua. Sin embargo, las diferentes configuraciones de las proteínas pudieran tener una restricción cuando son colocadas en la subfase de agua debido al carácter anfipático que muestran cada una de ellas. Se ha observado que a bajas presiones laterales coexisten las dos fases, la fase gaseosa y la fase líquida expandida, donde observaciones realizadas con MAB muestran únicamente a una textura de color gris. A lo largo de toda la monocapa no se observan dominios que pudieran revelar algún orden molecular y por lo tanto pudieran mostrar diferentes texturas i.e., éstos se encuentran en una fase desordenada. Sin embargo, a altas presiones laterales se presenta una segunda transición de fase *L/LC* en monocapas de las apolipoproteínas AI y AII, semejantes a la segunda transición de fase observada en la monocapa de la apo CI (Bolaños y col., 1999). Estas transiciones de fase vistas como cambios de organización en la monocapa y la pérdida de área durante la transición de fase así como también cambios de reflectividad, probablemente se deben a rearrreglos estructurales de la proteína como una consecuencia de la compresión lateral de la monocapa al separarse de la interfase un fragmento de la apolipoproteína. Estos

cambios estructurales están directamente relacionados con los valores de momento hidrofóbico, los cuales indican que las superficies de las proteínas pudieran estar asociadas o desprendidas de la superficie del agua. Así mismo, estos cambios estructurales de las apolipoproteínas consideramos que están asociadas directamente con su fisiología.



**Figura 17.** Isoterma típica  $\Pi$  vs  $a$  de la monocapa de la apo AI a 25°C. El inserto muestra una imagen de MAB justo en la transición de fase  $L/LC$ , a  $\Pi \sim 35 \text{ mN/m}$  y  $a \sim 1500 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ .

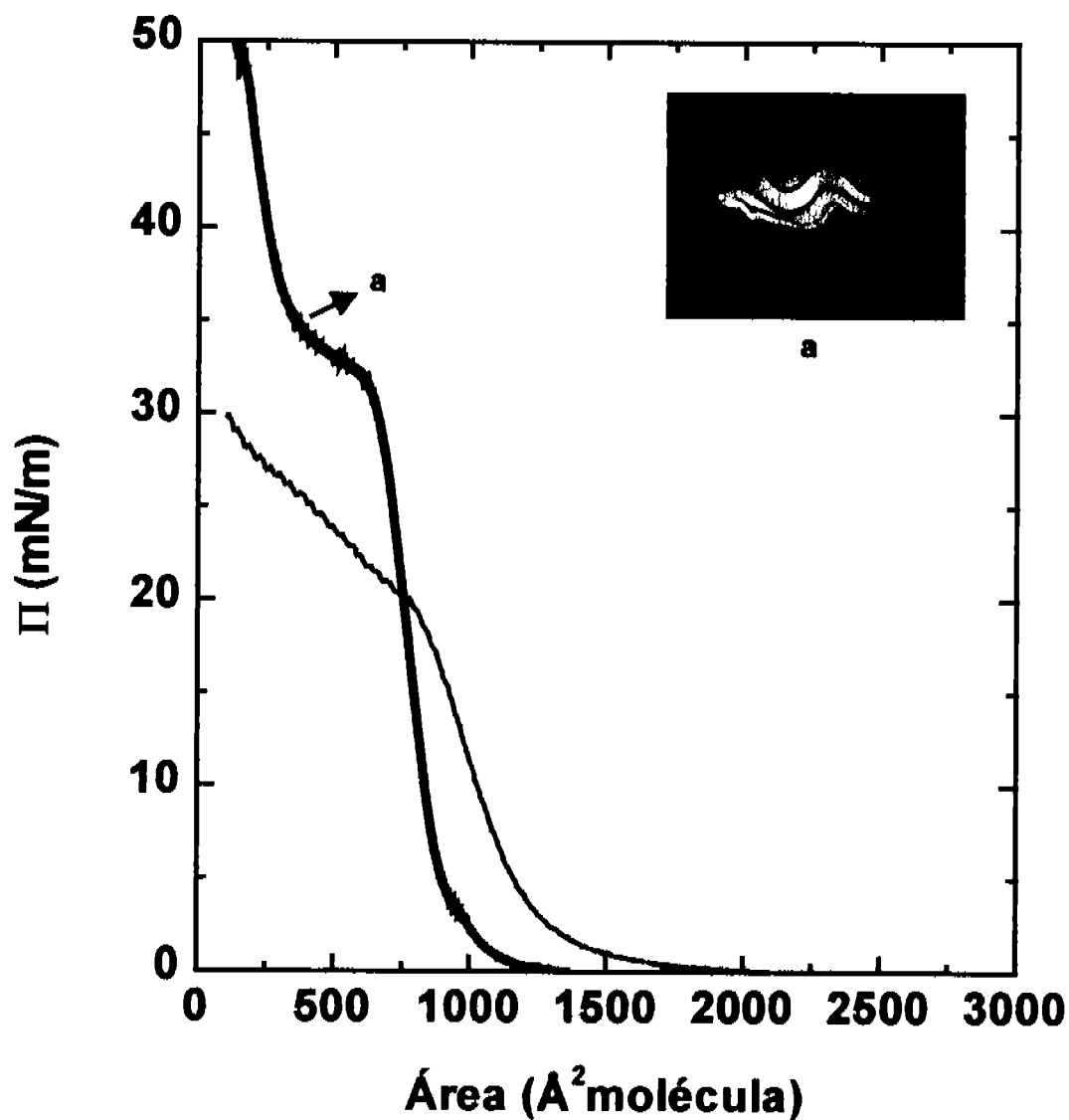
### **Isotermas y observaciones de MAB de las monocapas de Gibbs**

De acuerdo con los resultados anteriores, se ha demostrado que las apolipoproteínas intercambiables CI y AII forman monocapas de Langmuir cuando son dispersadas sobre la superficie de una subfase altamente iónica (Figuras 18 y 19). Las imágenes de MAB en ambas proteínas muestran a una fase fluida *L* (dominios oscuros), coexistiendo con la fase *LC* (dominios brillantes) y mostrando una transición de fase de primer orden a presiones laterales relativamente altas (insertos de las figuras 18 y 19). En ambos casos los dominios de la fase *LC* fueron nucleados a partir de la fase *L*, donde una hélice  $\alpha$  de cada cadena polipeptídica se desprende de la interfase aire/agua para orientarse hacia el aire.

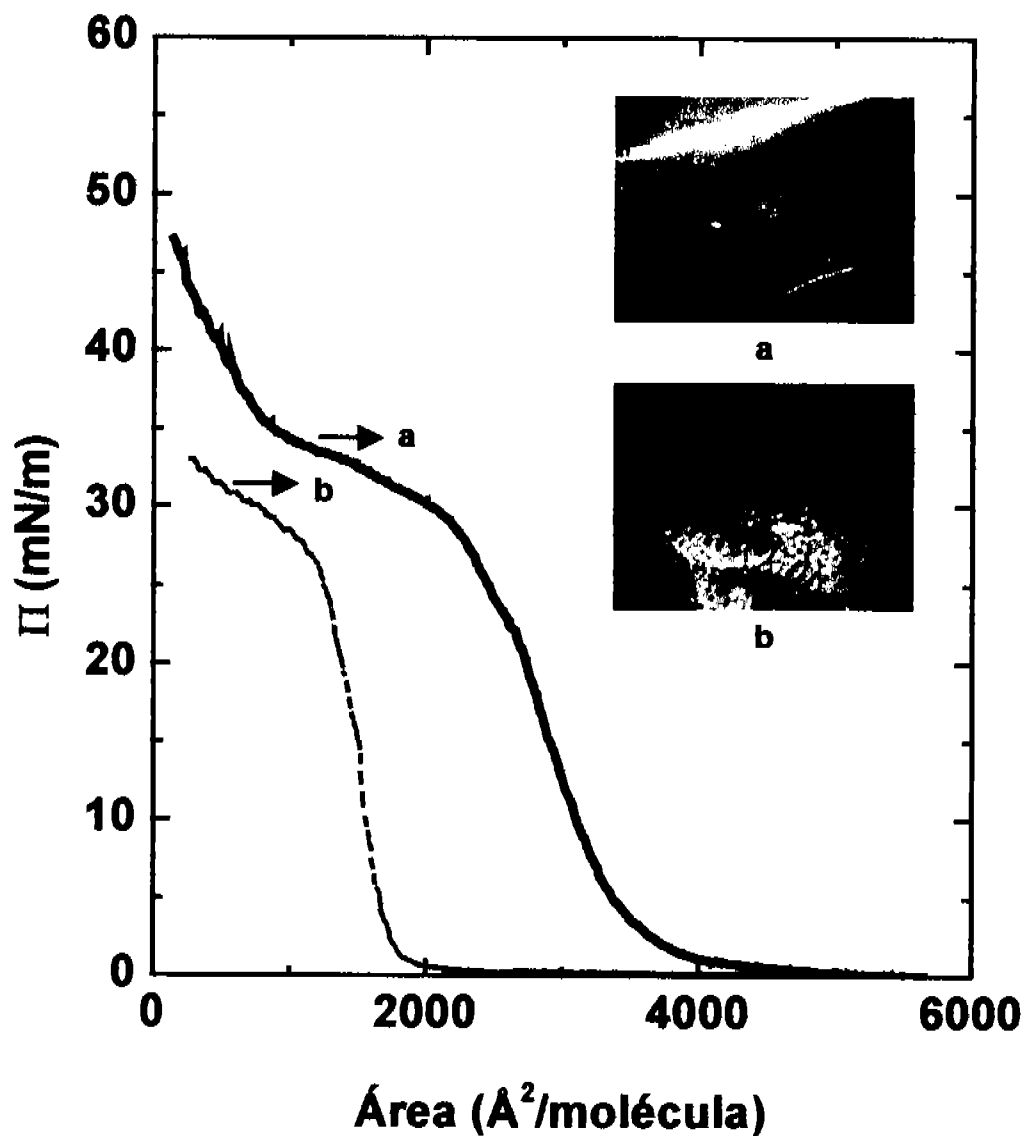
Cuando las apolipoproteínas CI y AII son depositadas sobre la superficie de una subfase de un amortiguador de fosfatos (pH 8.0) sin KCl, las proteínas solamente forman monocapas de Gibbs debido a su alta solubilidad. Una de las razones para utilizar una alta concentración de KCl (3.5 M) para formar monocapas de Langmuir, fue la de obtener una elevada densidad lo que favorece que las proteínas se difundan rápidamente hacia la interfase aire/agua. En las figuras 18 y 19 se muestran las isotermas de las monocapas de Langmuir y de monocapas de Gibbs de las apolipoproteínas CI y AII. Es evidente observar que existen grandes diferencias en las isotermas obtenidas de las monocapas con y sin una subfase de alta fuerza iónica. En la isoterma de la monocapa Gibbs de la apo CI se puede observar sólo la transición de fase *G/L*, mientras que la segunda transición de fase *L/LC* nunca se puede observar; sin embargo se presenta un cambio de dirección en la pendiente de la isoterma a una presión lateral de  $\Pi \sim 20 \text{ mN/m}$ . Las imágenes de MAB de la monocapa de esta proteína muestran texturas sin contraste de color gris oscuro a lo largo de toda la compresión lateral.

La monocapa de Gibbs de la apo AII presenta las dos transiciones de fase *G/L* y *L/LC* sin alcanzar un colapso típico a altas presiones laterales. La isoterma de Gibbs muestra una pérdida de área considerable con respecto a la isoterma Langmuir obtenida a partir de una subfase altamente iónica. Con un incremento en la presión lateral en la monocapa de Gibbs se presenta la segunda transición de fase *L/LC* justo a una presión lateral  $\Pi \sim 30 \text{ mN/m}$ , la cual se puede observar claramente con MAB (inserto de la figura 19). De la misma forma como en las monocapas de Langmuir, los dominios

oscuros corresponden a la fase *L* y los dominios brillantes a la fase *LC* condensada. Sin embargo, con un incremento en la presión lateral no se alcanza observar un colapso típico debido a que una gran cantidad de moléculas de proteína se difunde hacia la subfase.



**Figura 18.** Isotermas típicas  $\Pi$  vs  $a$  de las monocapas de la apo CI a 25°C. La proteína fue dispersada sobre una solución de fosfatos (pH 8.0 y 20 mM), conteniendo 3.5 KCl (línea gruesa) y sin KCl (línea delgada). El inserto muestra una imagen de MAB en la fase *L/LC* de una monocapa dispersada sobre KCl.



**Figura 19.** Isotermas típicas  $\Pi$  vs  $a$  de las monocapas de la apo AII a 25°C. La proteína fue dispersada sobre una solución de fosfatos (pH 8.0 y 20 mM), conteniendo 3.5 KCl (línea gruesa) y sin KCl (línea delgada). Los insertos muestran imágenes de MAB en la fase *L/LC*.

### **Referencias**

113. Anantharamaiah GM, Jones JL, Brouillette CG, Schmidt CF, Chung BH, Hughes TA, Bhowm AS, Segrest JP. Studies of synthetic peptide analogs of the amphipathic helix. Structure of complexes with dimyristoyl phosphatidylcholine. *J Biol Chem*. 1985. **260**:10248-10255.
114. Brasseur R, Meutter JD, Vanloo B, Goormaghtigh E, Ruyschaert JM, Rosseneu M. Mode of assembly of amphipathic helical segments in model high-density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta*. 1991. **1043**: 245-252.
115. Castro GR, Fielding CJ. Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre-beta-migrating high-density lipoprotein. *Biochemistry*. 1988. **12**: 25-29.
116. Hol WG, van Duijnen PT, Berendsen HJ. The alpha-helix dipole and the properties of proteins. *Nature*. 1978. **8**: 443-446.
117. Lockhart DJ, Kim PS. Internal Stark effect measurement of the electric field at the amino terminus of an alpha helix. *Science*. 1992. **14**: 947-951.
118. Scanu AM, Tardieu A. Temperature transitions of lipid mixtures containing cholesterol esters. Relevance to the structural problem of serum high density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta*. 1971. **231**: 170-4.



## Monolayers of Apolipoproteins at the Air/Water Interface

**Victor M. Bolaños-García**

*Department of Biochemistry, University of Cambridge, 80 Tennis Court Road CB2 1GA, Cambridge, England*

**Salvador Ramos and Rolando Castillo\***

*Instituto de Física, UNAM, P.O. Box 20-364, D.F., 01000 México*

**Juan Xicohtencatl-Cortes and Jaime Mas-Oliva**

*Instituto de Fisiología Celular, P.O. Box 70-243, D.F., 04510 México*

*Received: February 23, 2001*

Human apolipoproteins AII, CIII, E3, and AI were studied from different points of view: secondary structure prediction analysis, protein stability to overcome and revert thermal denaturation, and phase behavior of their monolayer. We found a well-preserved relationship among the predicted secondary structure, amphipathic  $\alpha$ -helices, and the ability to recover their secondary protein structure after thermal treatment. With each one of the apolipoproteins studied, the equilibrium character of the unfolding process and the presence of isochromatic points suggested a two-state character for the process. Pressure–area isotherms were carried out, as well as direct observations with a Brewster angle microscope of the apolipoproteins monolayers deposited onto a highly ionic water subphase. We described the gas/liquid-phase transition in all of these proteins. The apolipoproteins AI and AII present a phase transition between two condensed phases at high lateral pressures. A model of the secondary structure for these proteins is presented.

### 1. Introduction

Langmuir monolayers at the air/water interphase have been thoroughly studied for a long time. However, sensible advances have been obtained just in the past decade, because of new experimental techniques such as X-ray diffraction, polarized fluorescence microscopy, and Brewster angle microscopy (BAM). These new experimental techniques have revealed that most of the singularities in the surface pressure–area isotherms are due to phase changes, where each phase has a different molecular organization. The work of many different groups has contributed to obtain a general picture of the phase diagram of monolayers as well as the structure of their phases.<sup>1</sup>

Several studies have been carried out in protein monolayers made of horse muscle cytochrome,<sup>2–4</sup> acetylcholinesterase,<sup>5</sup> streptavidin,<sup>6</sup> human lung surfactant protein SP-B and its amino terminus (SP-B<sub>1–25</sub>),<sup>7</sup> tetra- $\alpha$ -helical heme proteins ( $\alpha\text{ss}\alpha$ )<sub>2</sub>,<sup>8</sup> and quite recently, a study with the human apolipoprotein CI<sup>9</sup> (APO CI) presented by our group. When APO CI was deposited onto a highly ionic water subphase, two first-order phase transitions were found under compression. The first phase transition involved the coexistence of a fluid condensed phase and a gas phase, whereas the second phase transition was a transition between two condensed phases. A protein model was proposed, where APO CI is made of two-amphipathic  $\alpha$ -helices bonded with a poorly structured polypeptide fragment. The second phase transition could be explained as a conformational change in the protein. This conformational change has been studied with X-ray diffraction<sup>10</sup> and with atomic force microscopy.<sup>11</sup>

This paper is devoted to the study of the human apolipoproteins (APOs) AII, CIII, E3, and AI. Because these molecules have not been X-ray solved, we present a complete secondary structure prediction analysis. We also present measurements of protein stability to overcome and revert thermal denaturation in different ionic strength conditions. This information helps us to understand the secondary structure predictions made in our study and explore the stability of these apolipoproteins in the different experimental conditions employed. Finally, we consider the monolayer phase behavior of these proteins, as a step toward the understanding of their behavior at interfaces, where their physiological function is important. The outline of the paper is the following: In section 2, a review of the human apolipoproteins is presented. Our experimental procedures are presented in section 3. In section 4, the results and a discussion are presented.

### 2. Human Apolipoproteins

Apolipoproteins combine with lipids in order to form several classes of lipoprotein particles. Different combinations of lipid and protein produce lipoprotein particles of different density, size, and, therefore, specific functions. APOs AI, AII, AIV, CI, CII, CIII, and E3 are known as exchangeable apolipoproteins because of their capability to move and exchange between lipoproteins.<sup>12</sup> Although this phenomenon has been well documented, the specific mechanisms that govern this behavior are still not well understood.

Human APO AII is a major component of the HDL (high density lipoproteins) particles and it is synthesized mainly in the liver.<sup>13–15</sup> Recent advances with APO AII genetics have suggested that this molecule plays a significant role in HDL

\* To whom correspondence should be addressed. E-mail: rolandoc@fenix.fisica.unam.mx.



**TABLE 1: Comparison between  $\mu H$  Values for the Different Regions Predicted as Amphipathic  $\alpha$  Helices in Four Exchangeable Apolipoproteins**

protein	number of residues in full protein	molecular weight (Da)	protein region	$\mu H$ /region
C terminal region of APO E3	299	34 200	204–221	0.28
			223–263	0.22
			266–287	0.42
APO AII	77	8708	7–27	0.49
			32–67	0.34
APO CIII	79	8760	7–41	0.21
			46–57	0.43
APO AI	243	28 300	9–47	0.28
			52–63	0.35
			69–163	0.27
			168–182	0.18
			189–240	0.28

$\alpha$ -helices are present in the carboxyl-end region of APO E3, encompassing residues 204–221, 223–263, and 266–287. In the case of APO AII, the predicted  $\alpha$ -helical segments include residues 7–27 and 32–67. APO CIII presents two amphipathic  $\alpha$ -helices that include residues 7–41 and 46–57. APO AI shows five sequences compatible with an amphipathic  $\alpha$ -helices practically covering the whole molecule and including residues 9–47, 52–63, 69–163, 168–182, and 189–240. The amphipathic  $\alpha$ -helical regions of the four apolipoproteins studied are shown in Figure 2 according to the helical wheel representation. It is clearly observed the typical asymmetrical distribution of nonpolar and polar amino acid residues in the different segments shown.

An estimation of the hydrophobic moment<sup>34,35</sup> for the amphipathic  $\alpha$ -helices of the APOs AII, CIII, E3, and AI was made with the PCGene Program (IntelliGenetics Inc., 1991) using the following expression:

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

Here,  $H_n$  is a theoretical value of the degree of partition of an amino acid between the surface and the interior of a globular protein, and  $\delta$  corresponds to the angle formed between amino acid lateral chains of two adjacent residues with respect to the plane of the  $\alpha$ -helix (for an ideal  $\alpha$ -helix,  $\delta = 100^\circ$ ).  $\alpha$ -helical regions with  $\mu H$  values higher than 0.2 kcal/mol per residue could be considered as good amphipathic  $\alpha$ -helices.<sup>36</sup> According to our calculations, which are presented in Table 1, the  $\alpha$ -helical motifs present in the C-terminal region of APO E3 correspond to good amphipathic  $\alpha$ -helices, because  $\mu H > 0.2$  kcal/mol per residue. The two  $\alpha$ -helices of APO AII gave also  $\mu H$  values higher than 0.2 kcal/mol per residue, as well as those of APO CIII. The only  $\alpha$ -helix segment that does not fulfill this situation is the region 168–182 of APO AI, with a  $\mu H$  value of 0.18 kcal/mol per residue.

**Circular Dichroism.** The far-ultraviolet CD spectra (pH = 8.0, 20 °C) for APOs AII, CIII, E3, and AI are presented in Figure 3a. These experiments were made before the preparation of the monolayers to ensure protein integrity. We observed two minimum spectra values. The first one is around 222 nm, which corresponds to  $\alpha$ -helix  $\pi$ - $\pi$  transitions. The second one is around 208 nm, which corresponds to both  $\alpha$ -helix  $\pi$ - $\pi^*$  and random coil  $\pi$ - $\pi^*$  transitions. In all cases, the mean molar ellipticity at 222 nm ( $[\theta]_{222}$ ) was independent of protein concentration through the range of 100–200  $\mu\text{g/mL}$ . APOs secondary structure is well maintained when the proteins are

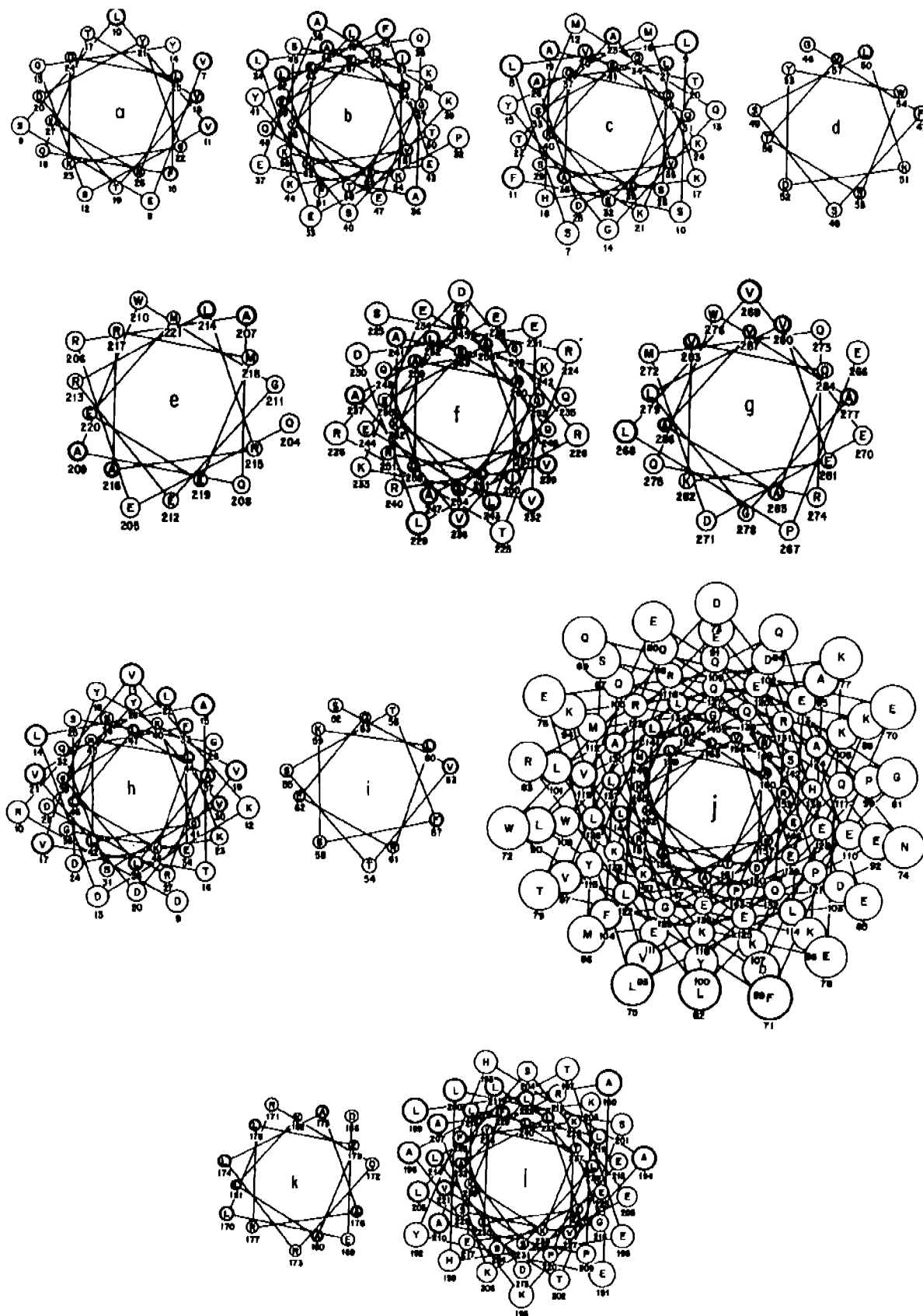
dispersed in high concentrated KCl solutions. This fact will be used later in the monolayer experiments described below. Figure 3b shows the CD spectra of these proteins when dispersed into a buffered (pH = 8.0) 3.5 M KCl solution. These dispersions, notwithstanding to be in a transient state, lasted enough time to make the CD experiments. These experiments support the fact that the amphipathic character of the APOs is preserved when they were deposited at the air–water surface of a highly concentrated KCl subphase.

To correlate protein stability and secondary structure content, a series of thermal denaturation experiments were carried out. As it is shown in Figures 4–7, APOs AII, CIII, E3, and AI, show a broad unfolding transition. In addition, all apolipoproteins showed a reversible heat unfolding character. Heating was performed from 20 to 90 °C followed by a reequilibration period at 20 °C, where the native structure was recovered (data not shown). Figures 4–7 show five independent curves for each heating condition. Because these curves are completely superimposable, the equilibrium character of the unfolding transition within the heat unfolding process is demonstrated.<sup>37</sup> Furthermore, the family of spectra recorded at several temperatures from 20 °C to 90 °C showed a well-defined isochromatic point at 204–205 nm for all of the APOs tested. In each case, the presence of an isochromatic point strongly suggests a two-state character. These results also showed that preservation of the  $\alpha$ -helix structure is temperature dependent and its stabilization is enthalpy-driven.<sup>37</sup> The heat unfolding curves found at 208 and 222 nm for APO AII and APO CIII during thermal denaturation show two transition states (inset Figures 4 and 5). Moreover, the heat unfolding behavior of APO AII and APO CIII found at 222 nm suggests low cooperativity. In contrast, APO AI apparently presents only one transition state, because thermal denaturation curves found at 208 and 222 nm present a sigmoidal shape (inset Figure 6). According to our results, it is not clear if the unfolding process observed for APO E3 involves two or three states (inset Figure 7). However, in previous studies investigating APO E3 stability under chemical denaturation conditions, it was proposed the existence of two structural domains and the presence of stable intermediate states.<sup>38</sup>

**Isotherms and BAM Observations.** Although apolipoproteins can be solubilized in water, they remain at the interface when spread directly onto a 3.5 M KCl subphase solution, so they behave as Langmuir monolayers. Below, we present several monolayer stability tests supporting this fact for the APOs studied here. It was recently confirmed that human APO CI shares this behavior.<sup>9</sup> Although, we do not have a direct experimental confirmation about the stability of the  $\alpha$  helices of the apolipoproteins studied here at the surface of the 3.5 M KCl subphase, the CD experiments reveal that their  $\alpha$  helices content is well preserved, when they are dispersed in concentrated KCl solutions. In addition, grazing incidence X-ray diffraction experiments for the APO CI monolayer have recently confirmed that  $\alpha$  helices remain stable at high lateral pressures, on this 3.5 M KCl subphase.<sup>10</sup>

Figure 8 shows typical isotherms for the apolipoproteins studied here, at pH = 8.0 and 25 °C. Several features are clearly recognized in these isotherms:

(a) A region of  $\Pi \sim 0$  mN/m, starting at a very low surface area density, whose ending is in the range of  $a = 5000$   $\text{\AA}^2/\text{molec.}$  for APO AII,  $a = 2500$   $\text{\AA}^2/\text{molec.}$  for APO CIII,  $a = 12\,000$   $\text{\AA}^2/\text{molec.}$  for APO AI, and  $a = 10\,500$   $\text{\AA}^2/\text{molec.}$  for APO E3 when the number of molecules in the monolayer is ca.  $3.83 \times 10^{14}$ . This behavior is reminiscent of a gas/



**Figure 2.** Helical wheel projections of amphipathic  $\alpha$  helices present in Apo AII (a and b), Apo CIII (c and d), Apo E3 (e–g), and Apo AI (h–l). Hydrophobic amino acid residues are circled with a thick line.

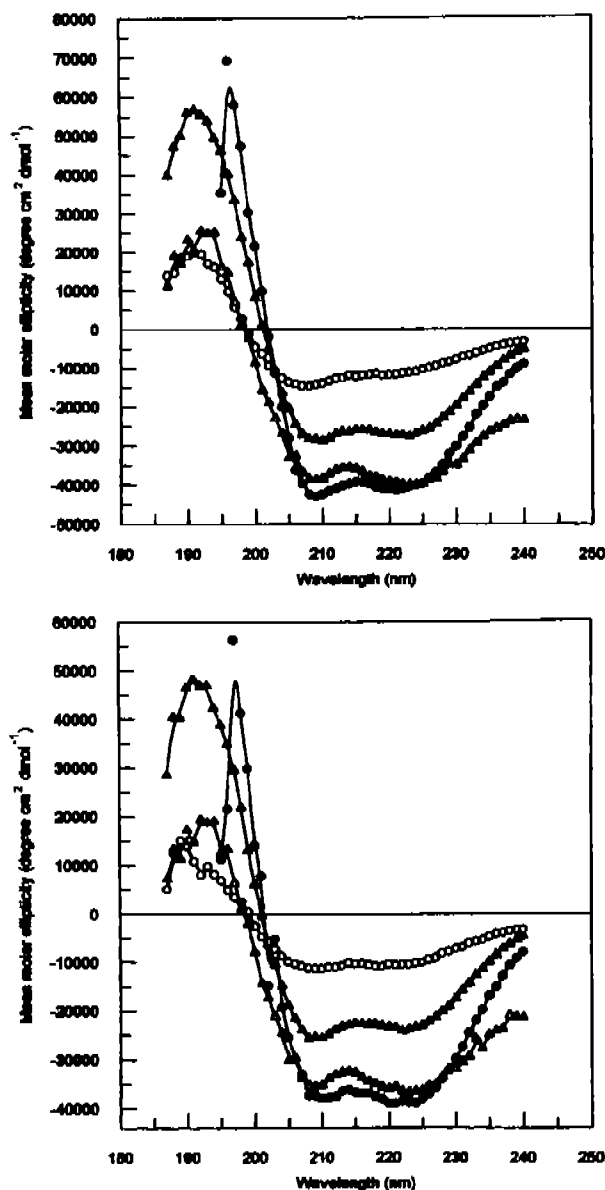


Figure 3. (a) Far-ultraviolet circular dichroism of APO AII (●), APO CIII (○), APO E3 (Δ), and APO AI (▲) in the phosphate buffered solution at 20 °C. (b) Far-ultraviolet circular dichroism of APO AII (●), APO CIII (○), APO E3 (Δ), and APO AI (▲) in the same buffered solution as in (a) containing 3.5 KCL at 20 °C.

condensed phase transition, although it was not possible to observe domains of condensed phase with the BAM. Nevertheless, for the case of APO E3 at very low densities ca.  $100\,000\text{ Å}^2/\text{molec.}$ , we can observe black circular areas corresponding to gas-phase surrounded by bright condensed areas. At the ending of the coexistence in all protein monolayers, when the lateral pressure starts to increase, there is a tenuous and continuous change in the reflectivity because of a more condensed phase.

(b) Afterward, there is an important increase in lateral pressure, typical of a low compressibility condensed phase ( $L_1$ ). Nevertheless, BAM observations did not allow us to see any well-defined domains. However, we could see defects in the monolayer and the way these defects move with a slower pace than similar defects in the gas/condensed phase coexistence. This fact reveals different viscosities in both phases.

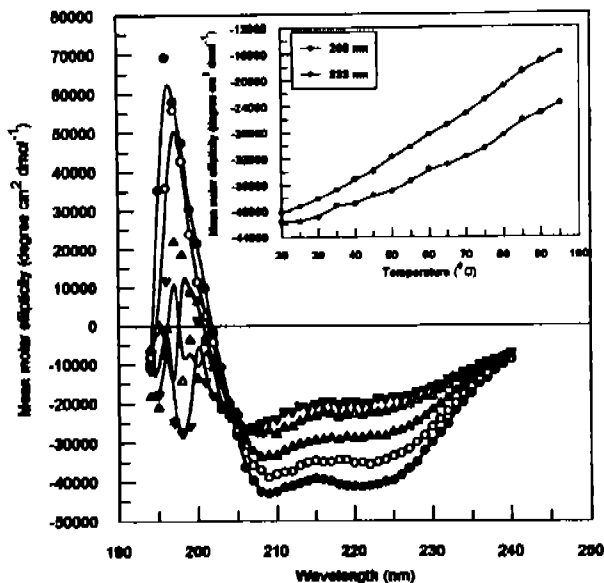


Figure 4. Temperature denaturation of APO AII studied by far-ultraviolet circular dichroism. Comparison of CD spectral characteristics at 20 (●), 40 (○), 60 (▲), 80 (Δ), and 90 °C (▼). Inset: mean molar ellipticity as a function of temperature taken at 208 and 222 nm

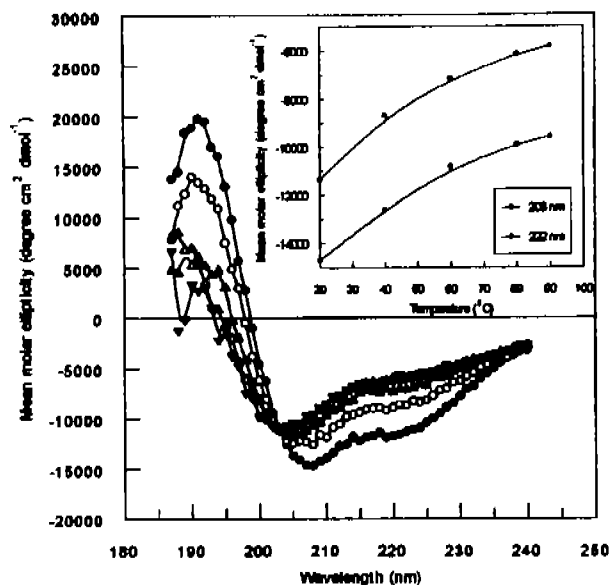
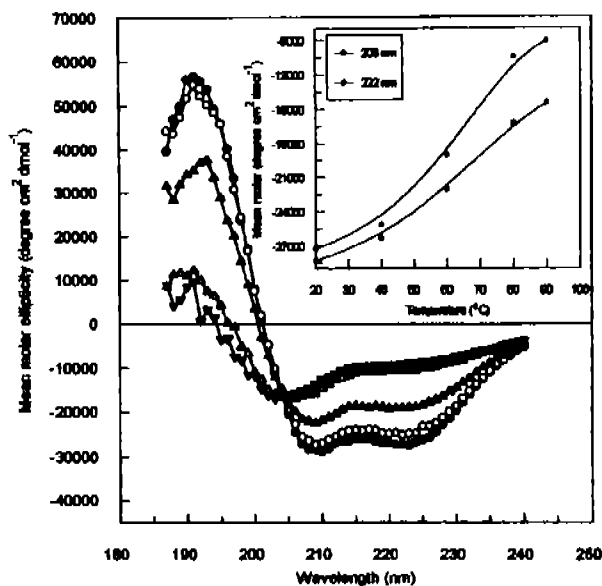
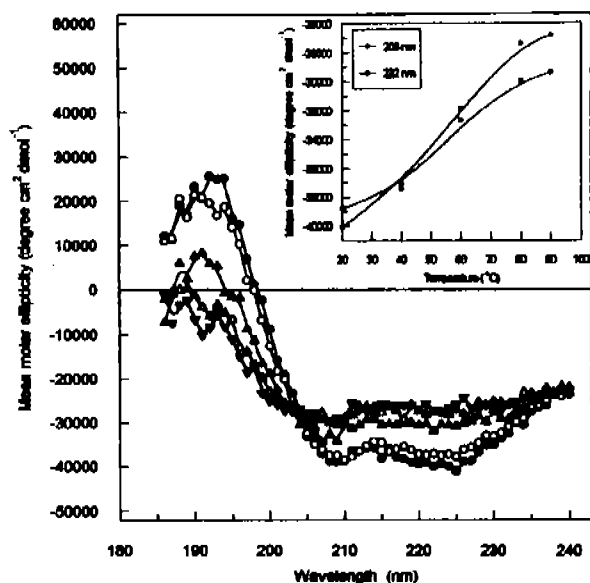


Figure 5. Thermal denaturation of APO CIII studied by far-ultraviolet circular dichroism. Comparison of CD spectral characteristics at 20 (●), 40 (○), 60 (▲), 80 (Δ), and 90 °C (▼). Inset: mean molar ellipticity as a function of temperature taken at 208 and 222 nm.

(c) After this point, the different proteins tested behave in a dissimilar way, because as pressure increases, APO AII and APO AI present, as described below, a second phase transition before the collapse. In the case of APO CIII, as soon as pressure increases, the monolayer collapses. This collapse takes place at  $\Pi \sim 32\text{ mN/m}$ , and it is confirmed with BAM observations (Figure 9). Here, many defects and mountain shaped structures typical of a collapse appear in the monolayer. However, in the case of APO E3, at the end of the compression, this apolipoprotein does not show a collapse, neither in the isotherms nor in BAM observations. We noticed that increasing the number of molecules in the monolayer above ca.  $4 \times 10^{14}$  the gas condensed phase transition end moves to higher area densities

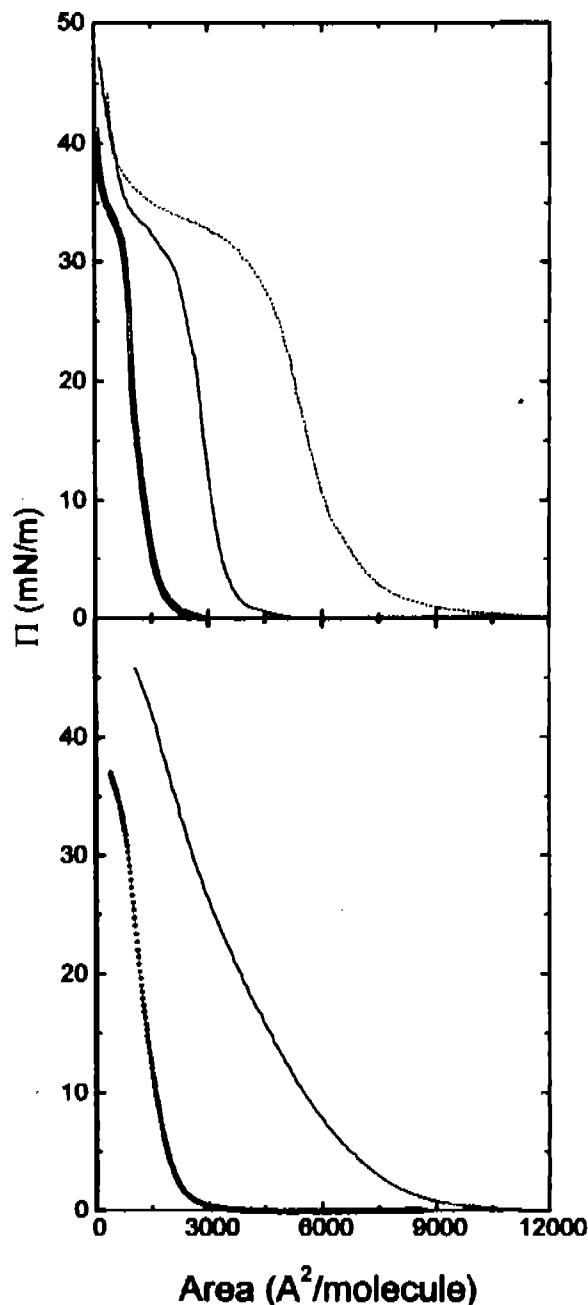


**Figure 6.** Thermal denaturation of APO AI studied by far-ultraviolet circular dichroism. Comparison of CD spectral characteristics at 20 (●), 40 (○), 60 (▲), 80 (△), and 90 °C (▼). Inset: mean molar ellipticity as a function of temperature taken at 208 and 222 nm.



**Figure 7.** Thermal denaturation of APO E3 studied by far-ultraviolet circular dichroism. Comparison of CD spectral characteristics at 20 (●), 40 (○), 60 (▲), 80 (△), and 90 °C (▼). Inset: mean molar ellipticity as a function of temperature taken at 208 and 222 nm.

(Figure 8b). One possibility for this behavior could be explained through protein solubilization in the subphase as soon as lateral pressure increases, similar to what has been observed in Gibbs monolayers. However, this seems not to be the case, because a monolayer of APO E3 with  $8.75 \times 10^{14}$  molecules left for more than 1 h at a lateral pressure of 33.7 mN/m presented a loss in lateral pressure of only 6 mN/m, for that elapsed time. Therefore, the rate of lateral pressure loss is negligible for the current compression times ( $\sim 1/2$  h). Also, at this concentration of proteins in the monolayer, we ran cycles of compression (up to  $\Pi \sim 40$  mN/m), expansion (down to  $\Pi \sim 0$  mN/m), and further recompression (up to  $\Pi \sim 40$  mN/m). Because it is common in monolayers, the expansion does not retrace the



**Figure 8.** Typical isotherms for the different Apolipoproteins studied here at 25 °C. Upper panel: isotherms of APO AII (—), APO CIII (---), and APO AI (· · ·). Lower panel: isotherms for APO E3 obtained by depositing different quantities of protein.  $3.8 \times 10^{14}$  (—) and  $11.5 \times 10^{14}$  molecules (· · ·).

compression isotherm but the next compression presented the same characteristics of the first compression, although some area is lost. These results are probably indicating that the protein monolayer is becoming organized in some way and not being solubilized in the subphase. Because, this protein presents a more complex tertiary structure than the other proteins studied here, it is not surprising that APO E3 might be more prone to molecular rearrangements.

As mentioned above, APO AII and APO AI present a second phase transition before the collapse. In the case of APO AII, when the condensed phase  $L_1$  is compressed, we find a wide kink at  $\Pi \sim 30\text{--}35$  mN/m and  $a \sim 1000\text{--}2500$  Å<sup>2</sup>/molec.,

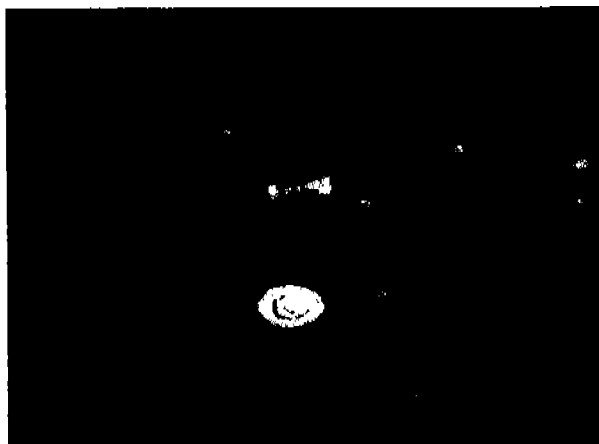


Figure 9. APO CIII collapsed monolayer at  $\Pi \sim 41$  mN/m and  $a \sim 200$  Å<sup>2</sup>/molec. as observed with BAM.

typical of a phase transition between two condensed phases ( $L_1/L_2$ ). BAM observations (Figure 10a,b) revealed that the monolayer changed from a tenuous gray to a bright gray. The bright areas are quite big domains, covering the entire field of view, without the presence of domains of different shades of gray. This phase transition is reversible, because cycles of compression and decompression show how the new phase appears at  $\Pi \sim 35$  mN/m, but with hysteresis. These observations seem to indicate that the  $L_1/L_2$  phase transition in APO AII is a first-order transition. At lateral pressures of the order of  $\Pi \sim 22$  mN/m, there is always a small change of slope in the isotherms, but we could not confirm if this corresponds to a phase transition. In the case of APO AI, at  $\Pi \sim 30$  mN/m and  $a \sim 4500$  Å<sup>2</sup>/molec, there is a change in the slope of the isotherm. However, domains appear in the BAM images until the lateral pressure reaches  $\Pi \sim 35$  mN/m (see Figure 11). The domains are big bright stripes without any shade of gray. They seem to be rigid, and in some cases, it is easy to observe with the BAM how the other phase, which is more fluid, flows between the big bright domains. We made compression and expansion cycles around the transition pressure. The domains appeared and disappeared as we were above or below  $\Pi \sim 35$  mN/m, respectively. Because the transition showed hysteresis, it seems to be a first-order phase transition. At the end of the compression, the APO AII monolayer collapses at  $\Pi \sim 47$  mN/m and  $a \sim 500$  Å<sup>2</sup>/molec. (Figure 10c). In the same way, when the APO AI monolayer reaches  $\Pi \sim 41$  mN/m and  $a \sim 500$  Å<sup>2</sup>/molec., it also collapses. Many defects (interference rings) as well as mountain shaped structures typical of collapse do appear in the BAM images.

To find out the stability of APO AII and APO AI monolayers on the air/water interface, we left monolayers at  $\Pi \sim 30$  mN/m for an hour. The decrease in lateral pressure observed was in the order of 3 mN/m. We also ran cycles of compression (up to  $\Pi \sim 44$  mN/m for APO AII and 39 mN/m for APO AI), expansion (down to  $\Pi \sim 0$  mN/m), and further recompression (up to  $\Pi \sim 45$  mN/m for APO AII and 40 mN/m for APO AI m). The expansion does not retrace the compression isotherm, but the next recompression presented the same characteristics of the first compression, although some area is lost (BAM images reveal more defects). All of these experiments and the reversibility of the  $L_1/L_2$  phase transition mentioned above seem to indicate that if protein is lost from the surface, when an isotherm is made, it must be at a negligible rate compared to the velocity of the compression.



Figure 10. BAM images of APO AII protein monolayer. (a) Just before the  $L_1/L_2$  transition, (b) at the  $L_1/L_2$  coexistence,  $\Pi \sim 30$ –35 and  $a \sim 1000$ –2000 Å<sup>2</sup>/molec., and (c) Collapsed monolayer  $\Pi \sim 47$  mN/m and  $a \sim 500$  Å<sup>2</sup>/molec.

We also prepared monolayers made of APO AII over subphases at pH = 7.0. The phase transition sequence was the same as that found at pH = 8.0, except that the second transition does occur at  $\Pi \sim 32$ –37 mN/m and between 900 and 2900 Å<sup>2</sup>/molec. Here, the isotherm is more horizontal than in the case of pH = 8.0 (data not shown). The small change of slope mentioned at pH = 8.0 ( $\Pi \sim 22$  mN/m) also appeared but in a more pronounced way.

We made grazing incidence X-ray diffraction experiments for the APO CIII monolayer in the  $L_1$  phase at  $\Pi \sim 30$  mN/m,



**Figure 11.** BAM image of the APO AI monolayer at the  $L_1/L_2$  coexistence,  $\Pi \sim 35$  mN/m and  $a \sim 1500$  Å<sup>2</sup>/molec.

as well, for the APO AI monolayer at two lateral pressures,  $\Pi \sim 29$  and  $35$  mN/m (BW1 beam line at the Hasylab synchrotron facility, using an intense X-ray beam of a wavelength of  $\lambda = 1.303$  Å, foot print  $\sim 10$  cm<sup>2</sup>,  $\theta \sim 0.12^\circ$ ). The contours of equal intensity vs the in-plane and out-of-plane scattering vectors components  $K_y$  and  $K_z$  revealed no peaks in all of the experiments. Therefore, the  $L_1$  phase of the APO CIII ( $\Pi \sim 30$  mN/m) and of APO AI ( $\Pi \sim 29$  mN/m), correspond to a liquid phase, because there is no ordering. For the case of APO AI, at  $\Pi \sim 35$  mN/m, all seems to indicate that the denser phase is a disordered phase.

On the basis of our results, it is reasonable to model the studied APOs as amphiphilic  $\alpha$  helices bonded by loose hinges. These proteins would be traveling on a landscape of close energy minimum configurations, when deposited onto a water subphase, which is also working as a thermal reservoir. The different protein configurations must have the restriction of being laying horizontally on the subphase, because of the amphiphilic character of these proteins, as discussed above. At low surface areas, two phases are coexisting, the gas and the liquid phase. BAM observations showed that, in both phases, there is only one kind of shade. There are no monolayer domains revealing some molecular order, which could give rise to different textures, i.e., they are disordered phases.

The second phase transition in the monolayers of APO AI and AII probably is similar to the phase transition between condensed phases of the monolayer of APO CI,<sup>9</sup> where proteins desorb one of its amphiphilic  $\alpha$ -helical segments from the surface, to occupy less surface area. This conformational change could explain the area loss and the high reflectivity difference between the phases. In addition, the desorbed  $\alpha$  helices probably are not correlated either intra- or supra-molecularly, because different textures are not observed in the domains of the condensed phases. The amphiphilic  $\alpha$ -helical segment going out from the surface must be that with the lowest  $\mu H$  value and short size. In such a case, the  $L_1/L_2$  transition seems to be of first-order, because of the large change of area per molecule. After the conformational change, protein molecules are considerably close to each other, surely increasing the attractive contribution to the free energy. Therefore, the transition must be governed primarily by the interplay between the conformational and the attractive contributions to the free energy. Grazing incidence X-ray diffraction experiments, as well as, atomic force microscopy studies on transferred monolayers are necessary to give a better understanding of this transition. These studies are underway.

The presence of amphiphilic  $\alpha$  helices might be considered a key factor in defining the physiological behavior of exchangeable apolipoproteins. We are certain that these kinds of studies will contribute to give a clearer picture of the mechanisms that facilitate the exchange of these proteins between lipoproteins and between lipoproteins and membranes as well as the structural changes related to their physiological function

**Acknowledgment.** We thank the help of J. Ruiz-García and G. Brezesinski for running the X-ray diffraction experiments as well as the beam time at Hasylab in DESY (Hamburg, Germany). This study has been partially supported by CONACYT and DGAPA-UNAM (Grants: MB072, 27513E, IN-212094, and IN-103598).

## References and Notes

- (1) Kaganer, V. M.; Möhwald, H.; Dutta, P. *Rev. Mod. Phys.* **1999**, *71*, 779.
- (2) Tanaka, H.; Akatsuka, T.; Murakami, T.; Ogoma, Y.; Abe, K.; Kondo, Y. *J. Biochem.* **1997**, *121*, 206.
- (3) Tanaka, H.; Akatsuka, T.; Ohe, T.; Ogoma, Y.; Abe, K.; Kondo, Y. *Polym. Adv. Technol.* **1998**, *9*, 150.
- (4) Tanaka, H.; Hayashi, K.; Akatsuka, T.; Murakami, T.; Toyama, J.; Noda, K.; Kida, T.; Ogoma, Y.; Fujii, T.; Kondo, Y. *J. Biochem.* **1995**, *117*, 1151.
- (5) Dziri, L.; Boussaad, S.; Wang, S.; Leblanc, R. M. *J. Phys. Chem. B.* **1997**, *101*, 6741.
- (6) Frey, W.; Schief, W. R.; Vogel, V. *Langmuir* **1996**, *12*, 1312.
- (7) Lipp, M.; Lee, K. Y. C.; Waring, A.; Zasadzinski, J. A. *Biophys. J.* **1997**, *72*, 2783.
- (8) Chen, X.; Moser, C. C.; Pillud, D. L.; Dutton, P. L. *J. Phys. Chem. B.* **1998**, *102*, 6424.
- (9) Bolaños-García, V. M.; Mas-Oliva, J.; Ramos, S.; Castillo, R. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 6236.
- (10) Ruiz-García, J.; Moreno, A.; Brezesinski, G.; Möhwald, H.; Mas-Oliva, J.; Castillo, R. To be published.
- (11) Xicohtencatl-Cortes, J.; Moreno, A.; Mas-Oliva, J.; Castillo, R. To be published.
- (12) Gotto, A. M. H.; Pownall, J.; Havel, R. J. *Methods Enzymol.* **1986**, *128*, 3.
- (13) Schonfeld, G.; Patsch, W.; Rudel, L. L.; Nelson, C.; Epstein, M.; Olson, R. E. *J. Clin. Invest.* **1982**, *69*, 1072.
- (14) Hussain, M. M.; Zannis, V. I. *Biochemistry* **1990**, *29*, 209.
- (15) López, J.; Laita, M.; Collet, X.; Vanloo, B.; Jung, G.; Deneffe, P.; Rosseneu, M.; Chambaz, J. *Eur. J. Biochem.* **1994**, *225*, 1141.
- (16) Luisi, A. J. *J. Lipid Res.* **1988**, *29*, 397.
- (17) Doolittle, M. H.; LeBoucq, R. C.; Warden, C. H.; Bee, L. M.; Luisi, A. J. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 16380.
- (18) Lagocki, P. A.; Scanu, A. M. *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 3701.
- (19) Havel, R.; Kane, J. P. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*; Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., Valle, E. L., Eds.; McGraw-Hill: New York, 1995; p 1841.
- (20) Quarfordt, S. H.; Michalopoulos, G.; Schirmer, B. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 14642.
- (21) Windler, E.; Havel, R. J. *J. Lipid Res.* **1986**, *26*, 556.
- (22) Mahley, R. W.; Weisgraber, K. H.; Farese, R. V. In *Williams Textbook of Endocrinology*, 9th ed.; Wilson, J. D., Foster, D. W., Kronenberg, H. M., Larsen, P. R., Eds.; W. B. Saunders: Philadelphia, PA, 1998; p 1099.
- (23) Mahley, R. W. *Science* **1988**, *240*, 622.
- (24) Scanu, A. M. *Lipids* **1978**, *13*, 920.
- (25) Schultz, J. R.; Vermynt, J. G.; Gong, E. L.; Nichols, A. V.; Rubin, E. M. *Nature* **1993**, *365*, 762.
- (26) Warden, C. H.; Hedrick, C. C.; Qiao, J. H.; Castellani, L. W.; Luisi, A. J. *Science* **1993**, *261*, 469.
- (27) Plumb, A. S.; Scott, C. J.; Breslow, J. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 9607.
- (28) Fielding, C. J.; Shore, V. G.; Fielding, P. E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1972**, *46*, 1493.
- (29) Yokoyama, S.; Fukushima, D.; Kupferberg, J. P.; Kozdy, F. J.; Kaiser, E. T. *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 7333.



## ***RESULTADOS II***

### **Monocapas de Langmuir de OTE**

Para generar películas de LB hidrofóbicas se realizaron transferencias de OTE en mica hidrofílica, desarrollando el procedimiento de Wood y Sharma (1994). OTE es un polímero ( $\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_{17} \text{Si}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_3$ ) que fue utilizado para producir superficies hidrofóbicas estables, densas y planas con la finalidad de realizar transferencias de las apolipoproteínas CI y AII a diferentes presiones laterales.

En la figura 20 se presenta una isoterma típica de presión lateral contra área ( $\Pi$ - $a$ ) para una monocapa de OTE. La monocapa de Langmuir se obtuvo después de dispersar una solución de OTE en cloroformo sobre una subfase de agua acidificada (pH 2.0) a 23 °C. Después de la hidrólisis y la polimerización de la monocapa de OTE, se comprimió a una velocidad de  $15 \text{ cm}^2/\text{minuto}$  hasta alcanzar un colapso típico. La isoterma que se obtuvo es esencialmente la misma a la obtenida por Wood y Sharma (1994). Durante la compresión de la monocapa de OTE se observa una coexistencia de fases a presiones laterales menores a  $1 \text{ mN/m}$  y un aumento de la presión para áreas menores a  $25 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ . Es importante mencionar que únicamente se utilizó monocapas de OTE que presentaron una isoterma con estas características, utilizadas para cubrir la mica por medio de un depósito de LB.

### **Imágenes de microscopía de ángulo de Brewster**

Las imágenes que se obtuvieron con MAB se utilizaron para visualizar y evaluar a las monocapas de OTE y para hacer los depósitos de LB de OTE sobre mica. Es importante mencionar que no existen reportes de observaciones directas de estas monocapas con MAB. En las diferentes imágenes de MAB se observa la hidrólisis y la polimerización de las moléculas de OTE que ocurren casi instantáneamente, una vez que se dispersan y tocan las gotas de la solución de OTE en la subfase de agua. Sin embargo, esto no evita la formación de una monocapa y a demás, es posible que este proceso continúe durante la evaporación del cloroformo así como el acomodo de la monocapa en la interfase aire/agua.

En la figura 21 se presentan imágenes de MAB de monocapas de OTE a diferentes presiones laterales. En la figura 21a se observa como la monocapa se organiza formando texturas homogéneas a  $\Pi \sim 0 \text{ mN/m}$  y  $a = 60 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ . Sin embargo, algunas monocapas presentan pequeños huecos que se desvanecen

conforme incrementa la presión lateral, hasta que la película forma grandes dominios homogéneos por arriba de  $\Pi > 10 \text{ mN/m}$ . Con MAB se observan estos grandes dominios homogéneos con pocos huecos y con tamaños del orden de milímetros que aparecen a  $\Pi \sim 25 \text{ mN/m}$  y  $a = 19 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ .

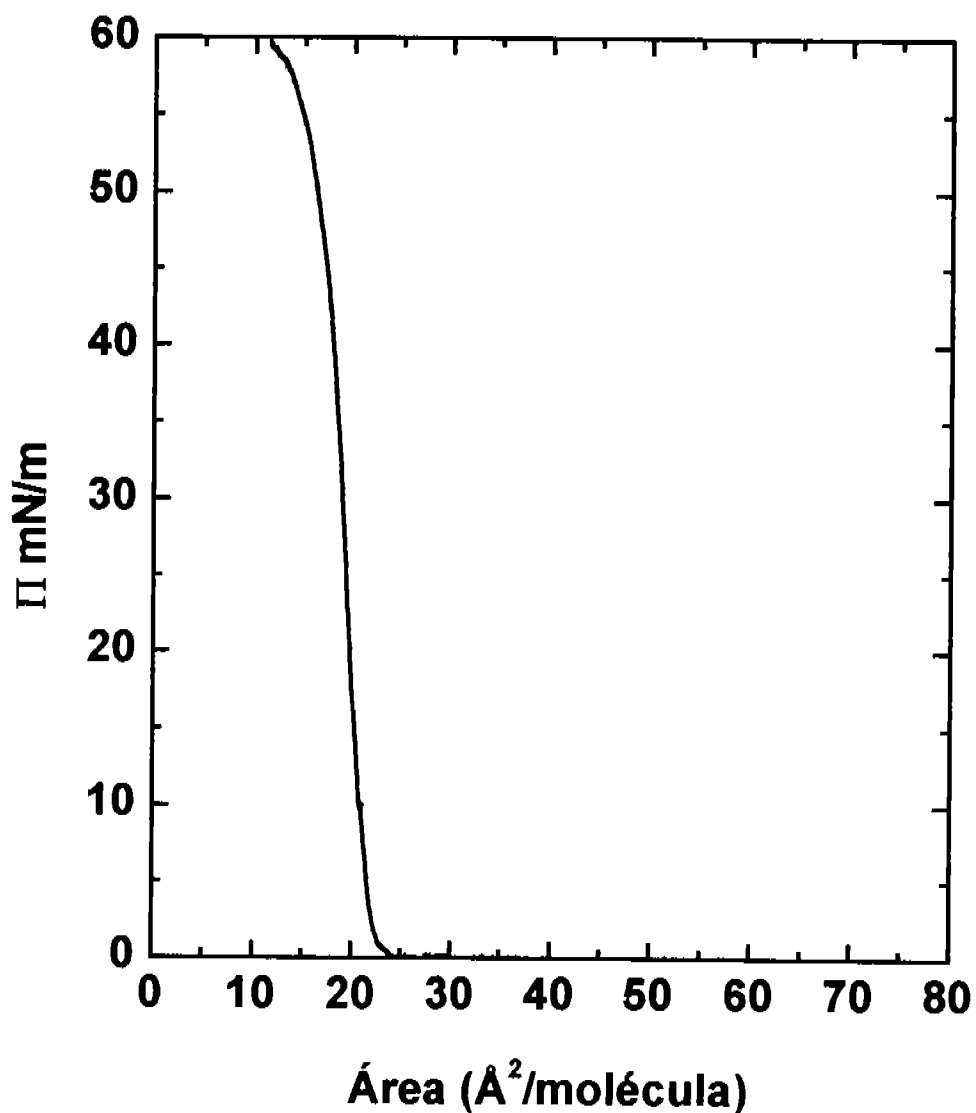


Figura 20. Isoterma típica de  $\Pi$  vs  $a$  de una monocapa de OTE en 23°C.

Las monocapas de OTE pueden presentar áreas extensas y dominios planos polimerizados que no cubren homogéneamente a la interfase aire/agua a  $\Pi > 0 \text{ mN/m}$ , representando un verdadero problema para lograr obtener transferencias homogéneas de películas de LB. Cuando se dispersa la solución de OTE en la subfase de agua se forman áreas con defectos durante las primeras etapas de polimerización, debido a la formación de dominios irregulares y a la rigidez de la monocapa. Cuando una monocapa con estas zonas defectuosas es comprimida, la mayoría de los grandes dominios se organizan formando zonas defectuosas de menor de tamaño hasta llegar a desaparecer. Sin embargo en algunos casos, aún después de comprimir a la monocapa, las áreas defectuosas no desaparecen completamente. Estos defectos únicamente pueden observarse con MAB debido a la poca sensibilidad con la que se mide la presión lateral que permite observar cambios sensibles en la isoterma. A  $\Pi = 0 \text{ mN/m}$  la película presenta grandes dominios polimerizados homogéneos, con algunas áreas de la subfase no cubiertas por estos dominios (Figura 21b) Con MAB se ha observado que las películas Langmuir de OTE presentan áreas que no están cubiertas en su totalidad, semejantes a la coexistencia gas-líquido expandido. En la figura 21c, se muestra un ejemplo donde estos dominios polimerizados no cubren apropiadamente a la subfase, conservado su textura hasta altas presiones laterales. Sin embargo, también se han obtenido películas de OTE más homogéneas cuando se utilizan soluciones de OTE a concentraciones menores a  $1.2 \text{ mg/ml}$ , en combinación con un esparcimiento cuidadoso y homogéneo de esta solución sobre la subfase.

### ***Imágenes de microscopía de fuerza atómica.***

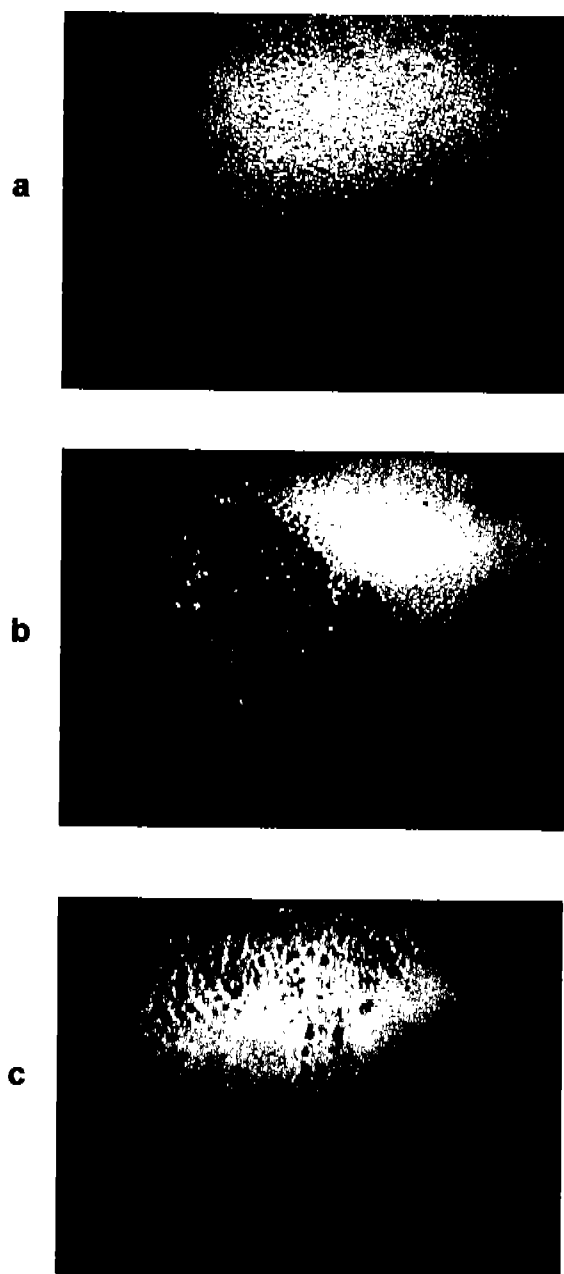
Se hicieron observaciones con MFA utilizando el modo contacto para monocapas de OTE, obtenidas de las transferencias de las películas de LB sobre mica a  $\Pi = 12 \text{ mN/m}$ . En las imágenes se pueden observar grandes dominios de OTE, que están cubriendo a la mica en forma homogénea y semicircular parecidas a las reportadas por Wood y Sharma (1995). Así mismo, las imágenes de MAB y MFA apoyan la propuesta que se tiene (Wood y Sharma 1994; Bourdieu y col., 1994) cuando las películas de OTE se encuentran en la interfase aire/agua en áreas moleculares relativamente grandes ( $a > 25 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ , a  $\Pi \geq 0 \text{ mN/m}$ ), las cuales están compuestas por islas polimerizadas semejantes a las de una fase condensada y rodeadas por una fase gaseosa. Estas

características son similares a la de una transición de fase *G/L*, presentes en sistemas anfífilicos convencionales. Los dominios condensados y la fase gaseosa deben de estar en equilibrio térmico como un químico, debido a la reacción de polimerización. Por lo tanto, el aumento que se observa en la presión lateral en la isoterma a áreas menores de  $\sim 25 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ , se debe a que los diferentes dominios son forzados a formar áreas sólidas. Si se realiza un análisis de altura de las imágenes obtenidas con MFA, se puede observar que la diferencia de altura entre los dominios de la fase condensada y los dominios de la fase gaseosa es de aproximadamente  $1.2 \pm 0.4 \text{ nm}$ . Cuando estas películas de LB son analizadas mediante el aparato de fuerzas, los dominios circulares presentan una la altura promedio de  $2.4 \text{ nm}$  (Campos y col., 2002).

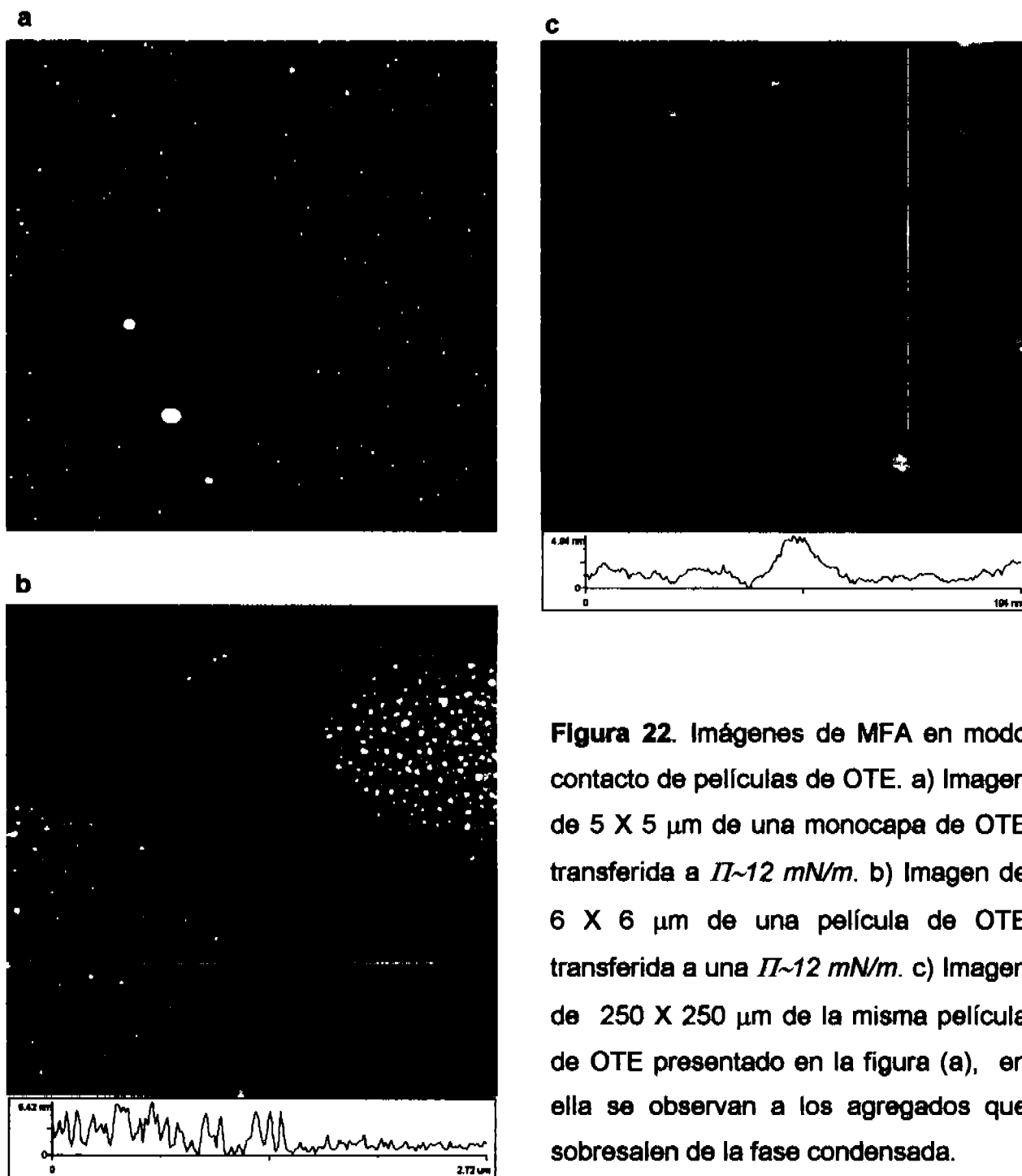
Con base en la discusión de las imágenes obtenidas con MAB, es necesario hacer un comentario importante debido a que se puede concluir lo siguiente, a una mayor presión lateral de transferencia de la monocapa se obtiene una mejor y más homogénea película de LB, i. e. a altas presiones laterales existe menos defectos en la monocapa. Sin embargo, barridos de MFA de muestras que han sido transferidas a presiones laterales mayores a  $\sim 15 \text{ mN/m}$ , revelan que parte del material que forma la monocapa es enviado hacia fuera de ésta formando estructuras que se asemejan a agregados tridimensionales. Estos tipos de estructuras se localizan de manera irregular sobre la monocapa, presentando diámetros del orden de  $50\text{-}100 \text{ nm}$  y alturas que pueden alcanzar hasta aproximadamente  $\sim 7 \text{ nm}$ . En la figura 22 se presentan imágenes de MFA utilizando el modo de contacto intermitente, donde se observan agregados 3D en forma de pequeños puntos brillantes. Agregados similares a éstos han sido observados en monocapas de OTE, formadas por autoensamblaje (Xiao y col., 1995) y con películas de LB de heptadecafluorotetrahidro deciltriethoxisilano depositadas en vidrio fundido (Ohnishi y col., 2000). En ambos casos, su presencia fue explicada como un producto de polimerización tridimensional, en la solución que se prepara antes de la hidrólisis. Estos agregados tridimensionales no pueden ser detectados con MAB, debido al bajo contraste que presenta la monocapa de OTE y a la limitada resolución espacial de MAB que es menor de  $4 \text{ }\mu\text{m}$ . Sin embargo, algunas veces sí fue posible localizar con MAB oscilaciones localizadas (Galván-Miyoshi y col., 2001) y abombamientos (buckling) (Bourdie y col., 1994) en las monocapas de OTE. Estos tipos de fenómenos son considerados como mecanismos de expulsión de material por fuera de la monocapa, por abajo del colapso y previamente observados en monocapas

rígidas. Los agregados tridimensionales son encontrados ocasionalmente cuando las transferencias se realizan a presiones laterales menores a  $\Gamma \sim 10-12 \text{ mN/m}$  y cuando la solución de OTE prepolimerizado se maneja con extremo cuidado. En particular, se debe tener mucho cuidado y evitar trazas de agua debido a que se producen pequeños cúmulos polimerizados. Todas las preparaciones de las soluciones de OTE en cloroformo se realizaron bajo una atmósfera de nitrógeno, con la finalidad de obtener superficies de OTE altamente limpias y homogéneas.

En la figura 22a se observa una imagen de MFA de una monocapa de OTE transferida sobre mica a  $12 \text{ mN/m}$  y en donde la solución de OTE prepolimerizada fue expuesta a trazas de agua. Estas imágenes muestran como las películas de LB presentan texturas en forma de pequeños puntos brillantes. Previamente, la solución prepolimerizada se pasó por un filtro de  $0.020 \mu\text{m}$  antes de dispersarla sobre la subfase de agua, para disminuir el número de agregados tridimensionales, sin alcanzar a eliminar a todos los agregados (Figura 22b). En esta imagen se observa muy claro la fase gaseosa y la fase condensada de la película de OTE, confirmando que los dominios de la fase gaseosa también están cubiertos por OTE, aunque con una menor densidad que en los dominios condensados. En la figura 22c se presenta una imagen de MFA de la monocapa de OTE sobre mica, en ella se observa la fase condensada con agregados. Estos agregados no están muy bien definidos en la imagen, porque son de naturaleza flexible (suave) y al interaccionar con la punta del microscopio no logran ser bien caracterizados.



**Figure 21.** Imágenes de MAB de monocapas de OTE en la interfase aire/agua, a 23°C. a)  $\Pi=0$  mN/m y  $a=60$  Å<sup>2</sup>/molécula se observan áreas homogéneas. b)  $\Pi=0$  mN/m y  $a=47$  Å<sup>2</sup>/moléculas. c)  $\Pi=15$  mN/m se observan áreas no homogéneas. En todas las imágenes de MAB la distancia horizontal corresponde a 850 µm.



**Figura 22.** Imágenes de MFA en modo contacto de películas de OTE. a) Imagen de 5 X 5  $\mu\text{m}$  de una monocapa de OTE transferida a  $\Pi \sim 12 \text{ mN/m}$ . b) Imagen de 6 X 6  $\mu\text{m}$  de una película de OTE transferida a una  $\Pi \sim 12 \text{ mN/m}$ . c) Imagen de 250 X 250  $\mu\text{m}$  de la misma película de OTE presentado en la figura (a), en ella se observan a los agregados que sobresalen de la fase condensada.



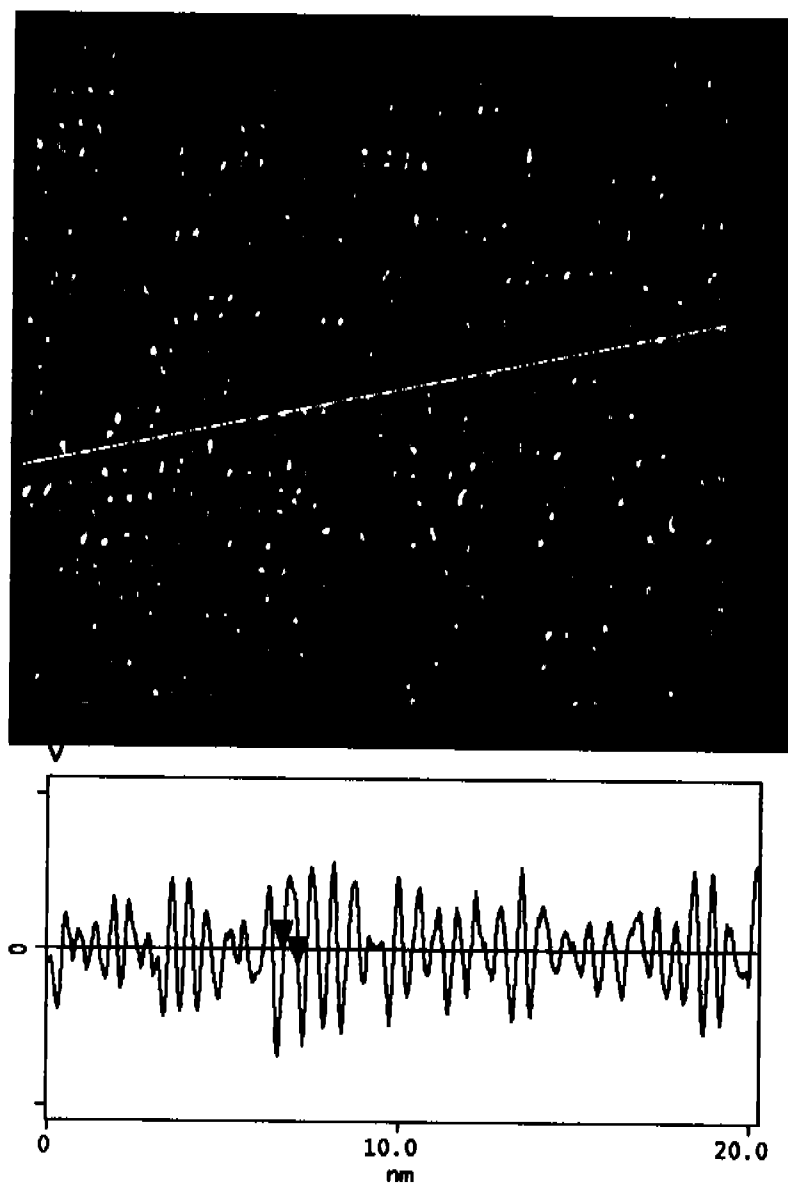
### ***Películas hidrofílicas de LB de las apolipoproteínas CI y AII***

Las monocapas de las apolipoproteínas CI y AII fueron transferidas a sustratos hidrofílicos (mica), tanto en la fase *L* como en la fase *LC* para ser analizadas mediante MFA. La región hidrofílica de las proteínas interaccionan con la superficie de la mica (carga negativa) y la región hidrofóbica interacciona con el aire. La información que se obtiene de los análisis de las películas de LB de las apolipoproteínas CI y AII, nos permiten hacer una interpretación de cómo se organizan las moléculas proteicas en la interfase agua/aire durante las diferentes transiciones de fase. Extrapolar la información que se obtiene con estos estudios, resulta sumamente interesante para tratar de entender el papel que juegan las apolipoproteínas en las superficies de las partículas lipoproteicas.

***Películas hidrofílicas de LB de la apo CI.*** Las monocapas de la apo CI fueron transferidas en mica hidrofílica durante la fase *L* a  $11\text{--}20\text{ mN/m}$ , justo antes de la segunda transición de fase *LC*. La figura 23 muestra una imagen de deflexión de MFA obtenida a alta resolución utilizando el modo contacto, para la película de LB de la apo CI. En esta imagen se observan líneas poco ordenadas con un grosor de 0.4-0.9 nm, que corresponde aproximadamente con el diámetro de una molécula de apo CI de 0.5 nm. Sin embargo, la longitud de estas líneas no se puede determinar con exactitud, porque no son líneas completamente continuas y ordenadas. A lo largo de estas imágenes se observan algunas líneas, con una longitud que corresponde al valor de una molécula de apo CI de 8.5 nm o de sus dos hélice  $\alpha$  (4.0 y 2.8 nm). Se ha observado que estas líneas cambian de dirección continuamente y se ha sugerido que el orden posicional que guardan las moléculas proteicas no es de largo alcance.

La falta de orden de las películas de LB, la fluidez observada con MAB (Bolaños-García y col., 1999) y la falta de picos de difracción de rayos X (Ruiz-García y col., 2003) parecen confirmar la naturaleza de un líquido bidimensional para la fase *L*. Se ha propuesto que las moléculas de la apo CI en la fase *L* a  $20\text{ mN/m}$ , se disponen paralelamente a la superficie de la mica. Por lo tanto, las dos hélice  $\alpha$  de la apo CI se encuentran dispuestas sobre la superficie del agua interaccionando con su cara hidrofílica, mientras que la cara hidrofóbica se orienta hacia el aire. Esta organización

de la proteína en la interfase aire/agua se fundamenta en su carácter anfipático, a la falta de libertad para tener cualquier otra orientación y a la densidad de la monocapa.



**Figura 23.** Imagen de MFA de una monocapa de apo CI transferida a  $\Pi$ -20  $mN/m$  a  $25^{\circ}C$ , mostrando su perfil vertical de voltaje. La distancia horizontal entre los patrones es de 0.5 nm, la cual corresponde con el diámetro de una hélice  $\alpha$ .

La figura 24 muestra una imagen en modo deflexión de MFA obtenida en modo contacto, para una monocapa de apo CI transferida en mica durante la transición de fase LC. En esta imagen se observan líneas brillantes separadas por líneas oscuras, localizadas en diferentes niveles de altura como se pueden apreciar con los distintos valores de contraste. Las líneas brillantes presentan un grosor de 1.5-2.0 nm y parecen estar formadas por dominios que se encuentra relativamente cercanos entre sí, formando líneas continuas a la resolución del MFA. En un perfil vertical de esta imagen se observan picos que corresponden a las líneas brillantes dispuestas irregularmente que no permiten una distancia significativa a lo largo de toda la superficie. Esto se debe probablemente a un arreglo de las hélice  $\alpha$  desprendidas de la superficie de la subfase con una altura coherente, indicando que la inclinación de las hélice  $\alpha$  no están ordenadas a lo largo de toda su longitud. La distancia promedio entre centro-centro de las líneas oscuras es de  $41.1 \pm 2.8 \text{ \AA}$ , valor que corresponde con la longitud del segmento hélice  $\alpha$  (7-30) de la apo CI. Estas líneas oscuras no corresponden a la mica, por lo tanto en un perfil vertical de la imagen se observan arreglos perpendiculares al eje de las líneas negras y estructuras no planas donde muestran dominios pequeños con un grosor cercano al diámetro de una hélice  $\alpha$ . Si bien estas medidas presentan un poco de ruido, es muy claro que la distancia promedio entre los dominios pequeños es de  $11.7 \pm 2.6 \text{ \AA}$ .

***Películas hidrofílicas de LB de la apo AII.*** Las monocapas de la apo AII fueron transferidas sobre mica hidrofílica a 25°C, durante la fase L a una presión lateral de 20 mN/m, justo antes de la segunda transición de fase L/LC. La figura 25 muestra una imagen de MFA en modo contacto, observándose como las moléculas de la apo AII se auto-organizan en líneas brillantes dispuestas horizontalmente sobre la superficie de la mica. El grosor de las líneas brillantes que se observan en la figura 25 es de ca. 1.7 nm; sin embargo, en diferentes películas de LB de la apo AII se han observado líneas que pueden alcanzar hasta un grosor de aproximadamente de ca 2.0 nm. La diferencia en los valores de diámetro de las líneas brillantes que se observan en las diferentes películas de LB, posiblemente se debe a que la apo AII es una proteína formada por dos cadenas polipeptídicas idénticas, unidas por un puente disulfuro en la posición 6 donde cada una esta formada por dos regiones hélice  $\alpha$  y una región estructurada en

forma irregular. Si bien, se esperaba que las cadenas polipeptídicas de la apo AII pudieran presentar una dirección semejante a como se habían observado en las películas de LB de la apo CI, el puente disulfuro probablemente establece un límite para la conformación de los grados de libertad de la apo AII. Pero el grosor de las líneas corresponde al doble valor de diámetro de una cadena hélice  $\alpha$  y las imágenes de MFA sugieren que estas líneas están formadas por dos cadenas polipeptídicas. Estas cadenas polipeptídicas están alineadas paralelamente sobre la superficie del agua, con las regiones hidrofóbicas expuestas hacia el aire y las regiones hidrofílicas interaccionando con la superficie de la mica. Sin embargo, las hélice  $\alpha$  en ambas cadenas polipeptídicas localizadas en el extremo opuesto del puente disulfuro, pueden presentar diferentes conformaciones por lo que no necesitan estar completamente paralelos y tampoco cercanos uno a otro. La nueva conformación que adquiere la proteína explica por qué las monocapas de la apo AII presentan fluctuaciones localizadas en los dominios de las diferentes muestras. El arreglo que guarda la monocapa de la apo AII no parece ser muy diferente, respecto a la monocapa de la apo CI. Sin embargo, el orden de la monocapa de la apo AII parece ser más grande que la apo CI, probablemente debido a la presencia de los puentes disulfuros.

La figura 26 muestra una imagen en modo deflexión de MFA de una monocapa de apo AII, transferida en mica a 25 °C durante la fase LC, a una presión lateral de  $\sim 38$  mN/m. En esta imagen se observa claramente la formación de líneas brillantes y oscuras, indicando las diferentes alturas entre la mica plana y la proteína. La altura a lo largo de las líneas brillantes (proteína) presenta una textura poco uniforme, debido a la extensión de los dominios brillantes de aproximadamente 2.0-2.5 nm de largo, indicando que la inclinación de las hélice  $\alpha$  no están ordenadas a lo largo de toda su longitud. Las líneas brillantes en forma de dominios elongados tienen un grosor promedio de ca. 2 nm, corresponden aproximadamente al diámetro de la proteína dimérica y presentan una distancia promedio entre centro-centro de las líneas oscuras de  $35.2 \pm 2$  nm. La formación de estas líneas brillantes es análoga a las que se observaron en monocapas transferidas de la apo CI durante la fase LC, donde parte de la molécula proteica se desprende de la superficie del agua y la otra se encuentra en la interfase aire/agua. En este caso, es muy probable que las dos hélice  $\alpha$  de la proteína desprendidas de la superficie, le confieran un incremento de tamaño a los dominios

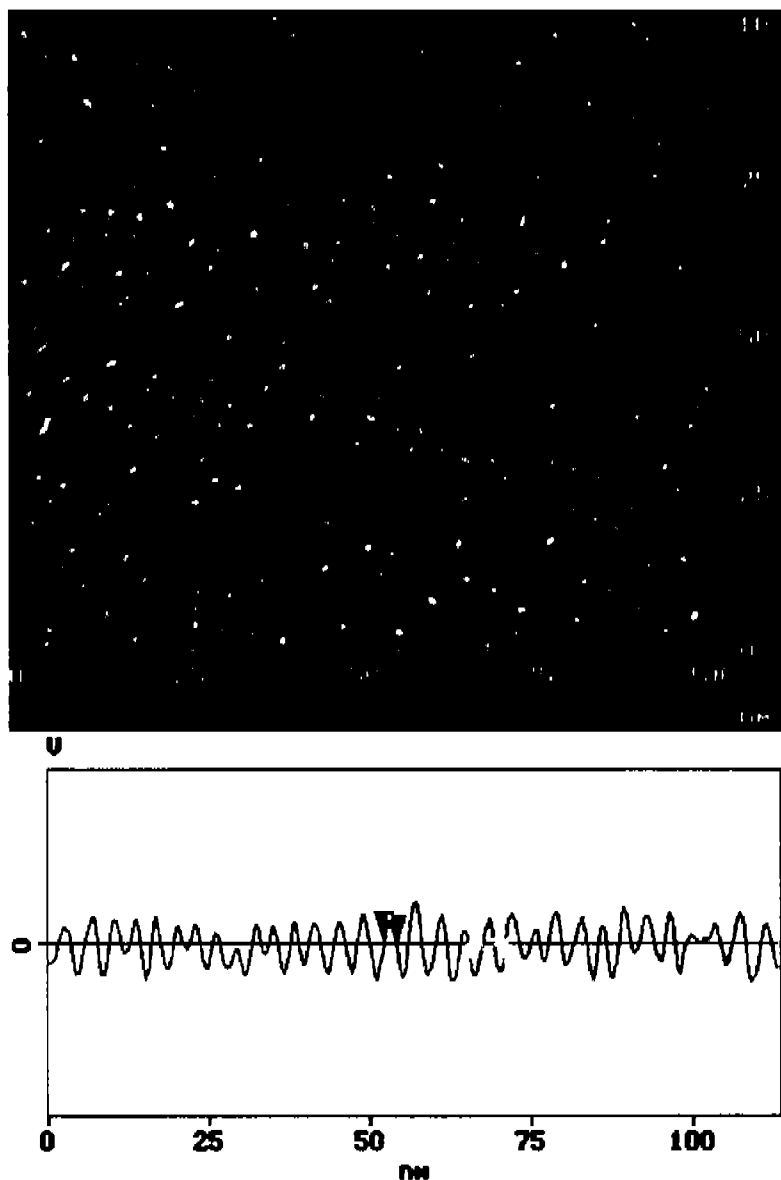
blancos debido a que la apo AII contiene dos cadenas polipeptídicas idénticas y cada una de ellas contiene dos hélice  $\alpha$  unidas por fragmento polipeptídico poco estructurado. Este cambio de conformación donde las dos hélice  $\alpha$  desprendidas de la interfase agua/aire y el otro par de hélice  $\alpha$  interaccionado con la superficie del agua, puede explicar la pérdida grande de área por partícula en la isoterma durante la transición de fase *L/LC*. Estos resultados coinciden con las imágenes obtenidas con MAB, ya que es una técnica muy sensible para diferenciar el grosor de la monocapa durante la transición de fase *L/LC*, donde los diferentes niveles de reflectividad entre los dominios de la fase *LC* (más altos) y los dominios de la fase *L* (más bajos), revelan las diferencias de altura de la monocapa. Sin embargo, es muy complicado poder definir con exactitud qué par de hélice  $\alpha$  se encuentra desprendida de la superficie del agua, si son los residuos de la región 7-27 o los residuos de la región 32-67 o si ambas hélice  $\alpha$  forman la pareja desprendida en alguna extensión o dirección. Considerando los valores de momento hidrofóbico, la región hélice  $\alpha$  (32-67) se encuentra sobre la interfase agua/aire con un valor de 0.49 kcal/mol por residuo, mientras que la región hélice  $\alpha$  (7-27) se orienta hacia el aire con un valor de 0.34 kcal/mol por residuo. Las observaciones hechas con MFA confirman este hecho y las imágenes obtenidas durante la fase *LC* muestran líneas oscuras con una distancia promedio de separación de 35.2 Å muy cercanas a la longitud de las hélice  $\alpha$  cortas (31.5 Å) y aún más cortas con respecto a la longitud de las hélice  $\alpha$  grandes (54.0 Å).

### ***Películas hidrofóbicas de LB de las apolipoproteínas CI y AII***

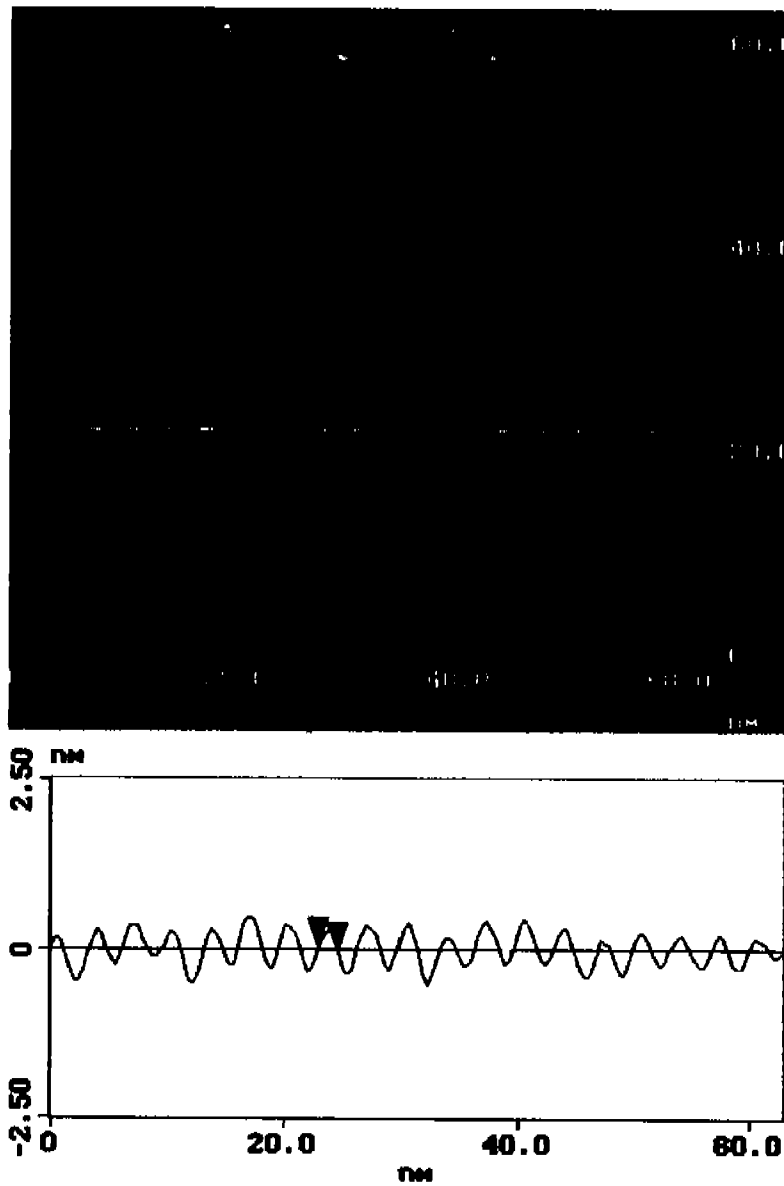
Las monocapas de las apolipoproteínas CI y AII fueron transferidas en sustratos hidrofóbicos de OTE durante la fase *L*, justo a una presión lateral de 20 mN/m. La diferencia con las superficies hidrofílicas, es que aquí la región hidrofóbica de las hélice  $\alpha$  se encuentran asociadas a la superficie hidrofóbica del sustrato y la cara hidrofílica queda expuesta hacia el aire.

Para las películas hidrofóbicas de LB de las apolipoproteínas CI y AII, no se realizaron transferencias durante la fase *LC* debido a que el proceso de depósito destruiría la conformación de la proteína en esta fase, debido a la fuerte interacción hidrofóbica entre las superficies de las proteínas y la película de OTE. Así mismo, las transferencias realizadas en superficies hidrofóbicas (mica-OTE) fueron más fáciles de

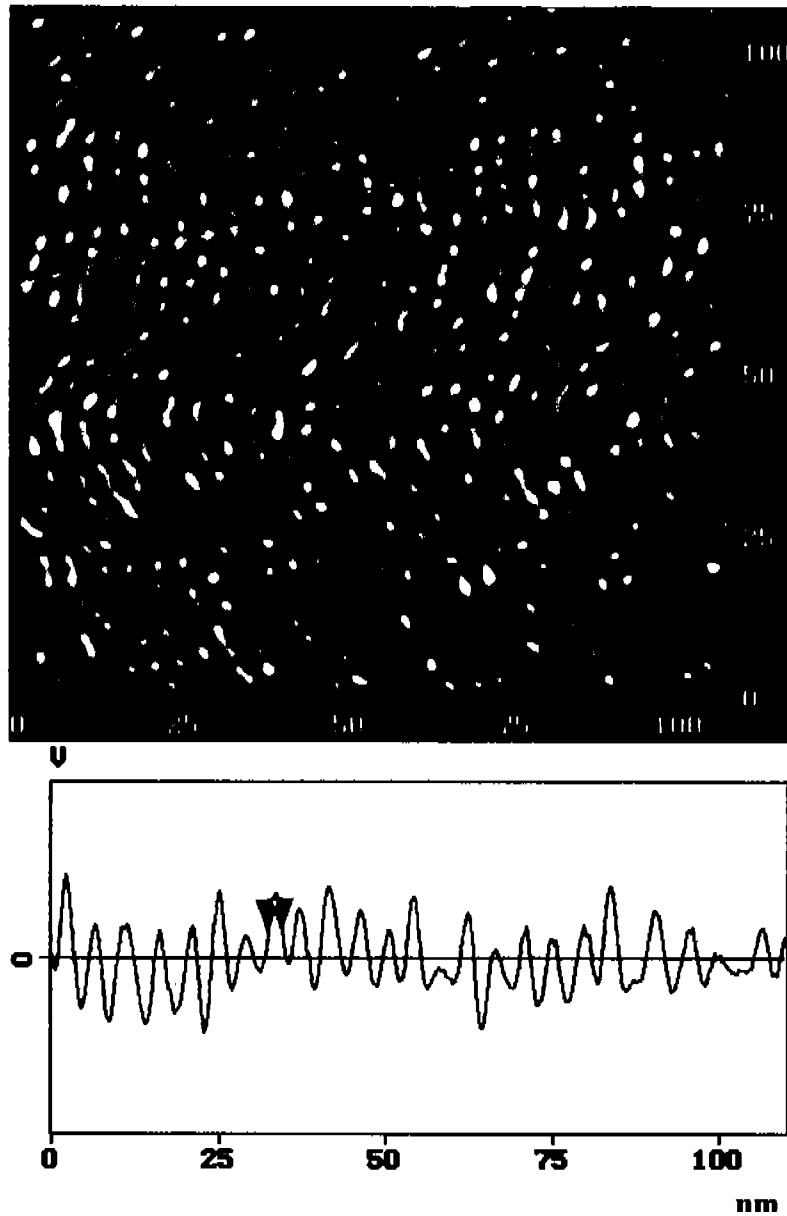
trabajar que las que se realizaron en mica, observando una mejor y mayor adsorción en las imágenes de MFA.



**Figura 24.** Imagen de MFA una monocapa de apo CI transferida sobre mica a  $\Pi \sim 43$   $mN/m$ , después de la transición de fase  $L/LC$ . El perfil de voltaje vertical muestra una distancia horizontal entre los dominios grises de 2.0 nm y una distancia entre los dominios oscuros de 4.2 nm.



**Figura 25.** Imagen de altura de MFA de una monocapa de apo AII transferida sobre mica a  $\Pi \sim 20$  mN/m a 25°C. El perfil de voltaje vertical muestra una longitud entre las líneas oscuras de 1.7 nm y una altura entre las líneas grises de 0.45 nm.



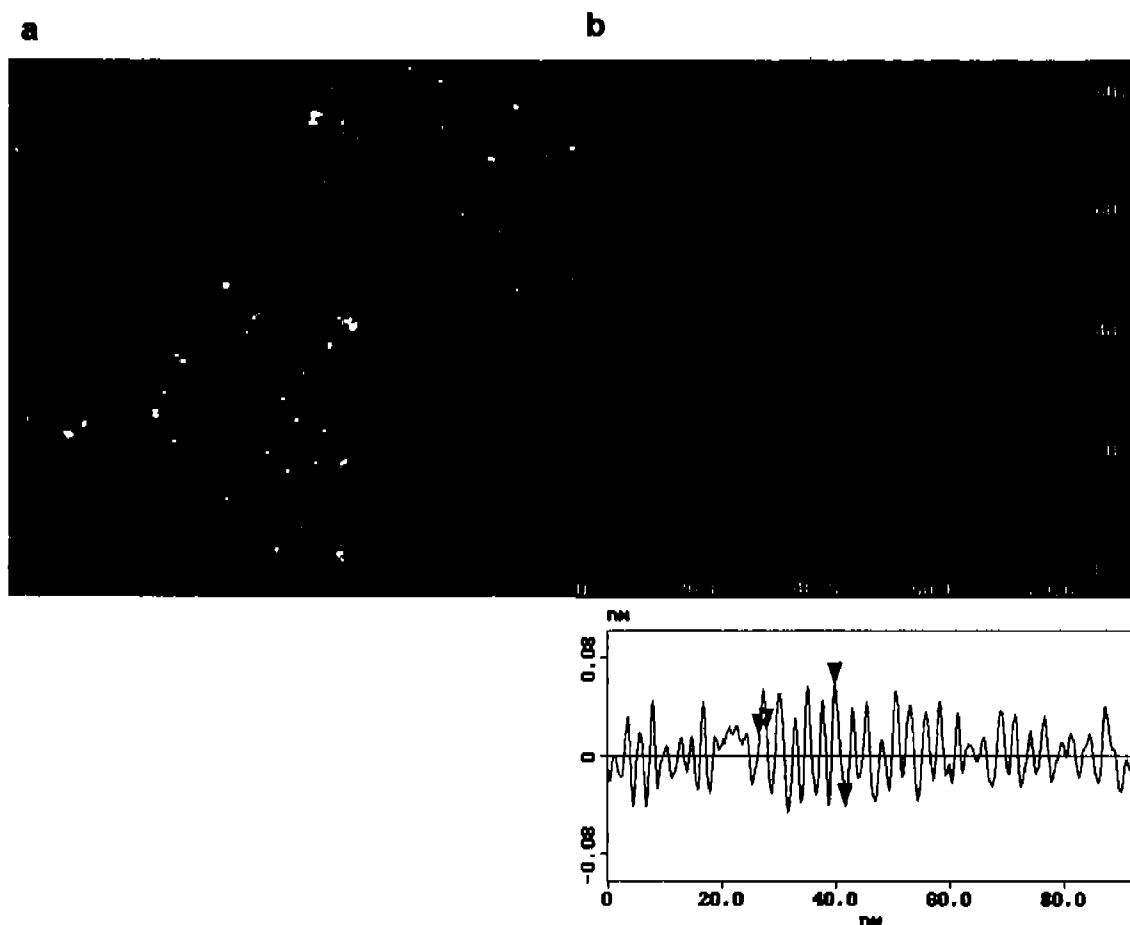
**Figura 26.** Imagen de deflexión de MFA de una monocapa de apo AII transferida en la fase *LLC* en mica hidrofílica a 25°C. El perfil de voltaje vertical muestra una longitud entre los dominios grises de 2.1 nm.



***Películas hidrofóbicas de LB de la apolipoproteína CI.*** Las monocapas de la apo CI fueron transferidas sobre mica hidrofóbica durante la fase *L* y ambas hélice  $\alpha$  se organizan en forma paralela sobre la superficie de la subfase de agua. Sin embargo, la diferencia con respecto a las películas hidrofílicas (Figura 23), en este caso la región hidrofóbica de ambas hélice  $\alpha$  de la proteína está interaccionando con la superficie de la película hidrofóbica (mica-OTE), mientras que la región hidrofílica se orienta hacia el aire. La figura 27a muestra una imagen de MFA en modo contacto intermitente de una monocapa de apo CI, transferida sobre una película de OTE con agregados tridimensionales. En una comparación de esta figura con las figuras 22a y 22b, se observa como la monocapa de la proteína está cubriendo a la película hidrofóbica de OTE cuya superficie presenta imperfecciones. Las áreas con imperfecciones son al parecer áreas cubiertas por cristales de KCl, que se originan durante el depósito y la remoción cuando se procede a diluir la solución de sal. En la figura 27a se observan algunas áreas brillantes de manera difusa, las cuales corresponden a áreas con pequeños cristales que permanecen en la película de LB. Los pequeños cristales de KCl generan un importante problema durante los barridos, entre estas zonas y la punta de MFA. En todos los experimentos realizados se observó que cuando se usa mica hidrofóbica, las películas de LB presentan un menor número de agregados que sobresalen. Independientemente, de que estas películas hidrofóbicas presentaran pequeñas áreas irregulares, con MFA se buscaron áreas planas lejos de los agregados con la finalidad de facilitar los barridos. De todas las observaciones que se realizaron a lo largo del presente estudio, se consideró que los agregados no modifican la transferencia de las películas de LB.

La figura 27b presenta un ejemplo de una imagen de MFA en modo contacto de una monocapa de apo CI, transferida en la fase *L* sobre mica hidrofóbica. En esta imagen de altura no se observa un orden posicional de largo alcance y las líneas parecen estar formadas por secuencias de dos unidades, probablemente revelando el carácter líquido de esta fase. Cada una de estas líneas presenta un grosor de ca. 1.3 nm y cada dos unidades unidas muestran una longitud promedio de 7.7 nm. Estos valores corresponden aproximadamente con el grosor y la longitud de dos hélice  $\alpha$ , para una molécula de apo CI. Sin embargo, el valor del grosor de una unidad es más

grande que el que uno esperaría para una hélice  $\alpha$  (0.7-10 nm), probablemente se deba a un defecto producido por el tamaño de la punta del MFA.



**Figura 27.** a) Imagen de MFA en modo intermitente ( $5 \times 5 \mu\text{m}$ ) de una monocapa de apo CI transferida a una película de OTE con agregados. b) Imagen de altura de MFA de una monocapa de apo CI transferida sobre mica hidrofóbica a una  $\sim 20 \text{ mN/m}$  (esta imagen no está relacionada con la imagen del inciso (a)). En esta imagen se observa la superficie hidrofílica de las hélice  $\alpha$ . La distancia horizontal entre las líneas grises es ca. 1.3 nm. La distancia vertical entre las líneas negras es de 0.1 nm y la distancia horizontal entre ellas es ca. 1.8 nm.

***Películas hidrofóbicas de LB de la apolipoproteína AII.*** La figura 28 muestra una imagen de MFA en modo contacto de la monocapa de la apo AII, transferida en la fase L a una presión lateral de 20 mN/m. En esta figura se observa como las moléculas se organizan en arreglos irregulares en forma de líneas con un grosor aproximado de 1.5 nm, y un valor cercano al diámetro de las dos hélice  $\alpha$ . Consideramos que las hélice  $\alpha$  de la proteína están orientadas sobre la superficie de la mica hidrofóbica, mientras que las regiones hidrofílicas están expuestas hacia el aire.

### ***Modelo de la apolipoproteína CI***

Con base en los resultados que obtenidas utilizando MFA, se ha propuesto un modelo para representar la orientación de las hélice  $\alpha$  de la apo CI, en la fase L y en la fase LC. Durante fase L a una presión lateral de 20 mN/m, las hélice  $\alpha$  se encuentran dispuestas de manera paralela sin un orden de largo alcance, colocadas con su eje largo paralelo a la superficie del agua y con la cara hidrofóbica expuesta hacia el aire (Bolaños y col., 1999; Ruiz-García y col., 2003). En la figura 29a se presenta un modelo para la monocapa de la apo CI en la interfase agua/aire durante la fase L.

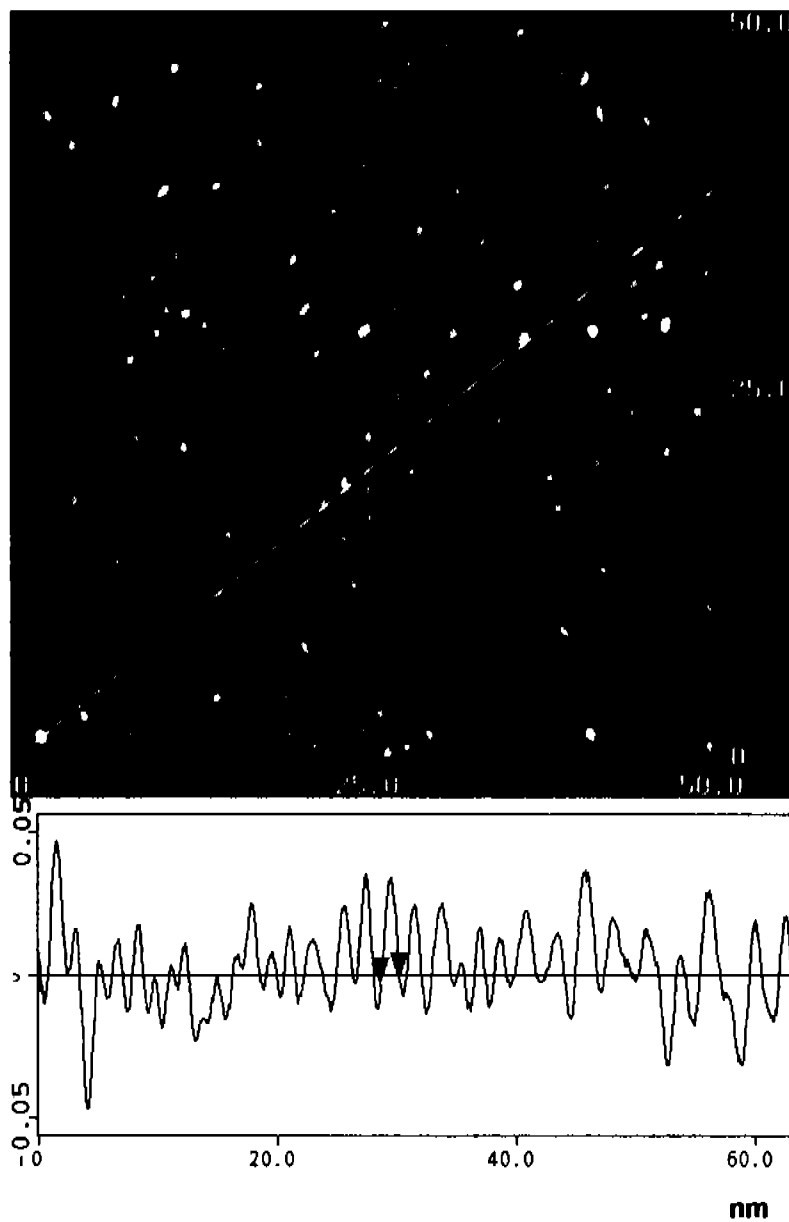
En la figura 29b se hace una representación de la monocapa de la apo CI durante la segunda transición de fase LC. En este modelo se propone que la hélice  $\alpha$  (7-30) que es la más larga se encuentra probablemente asociada a la superficie del agua, mientras que la hélice  $\alpha$  (35-53) que es más corta se encuentra desprendida de la superficie del agua orientándose hacia el aire. Este cambio estructural de la apo CI se debe probablemente a que la hélice  $\alpha$  más larga presenta un valor de momento hidrofóbico de 0.54 kcal/mol por residuo, mientras que la hélice  $\alpha$  corta presenta un valor de momento hidrofóbico de 0.36 kcal/mol por residuo. El valor alto de momento hidrofóbico de la hélice  $\alpha$  más larga, favorece que su región hidrofílica esté más propensa a interaccionar con la superficie del agua. La orientación de las hélice  $\alpha$  cortas guarda una gran correlación con las imágenes de MFA donde se observan dominios brillantes defectuosos con un grosor variable, un alineamiento poco ordenado y con un ángulo de inclinación poco perfecto. Las hélice  $\alpha$  largas en la superficie corresponden a las líneas oscuras de la figura 24, mientras que las hélice  $\alpha$  cortas, las cuales están desprendidas de la superficie, forman un ángulo no determinado

probablemente formando los dominios o líneas brillantes de gran contraste. Debido al ángulo de inclinación que forman las hélice  $\alpha$  cortas con el plano de la superficie del agua, en este modelo (Figura 29b) se explica porqué el grosor de las líneas brillantes presentan una longitud de entre 1.5-2.0 nm valores cercanos a la longitud de la hélice  $\alpha$  corta. Además, la distancia promedio entre centro-centro de las líneas negras es de aproximadamente 4.5 nm, medida que corresponde con el tamaño de la hélice  $\alpha$  larga (Figura 24).

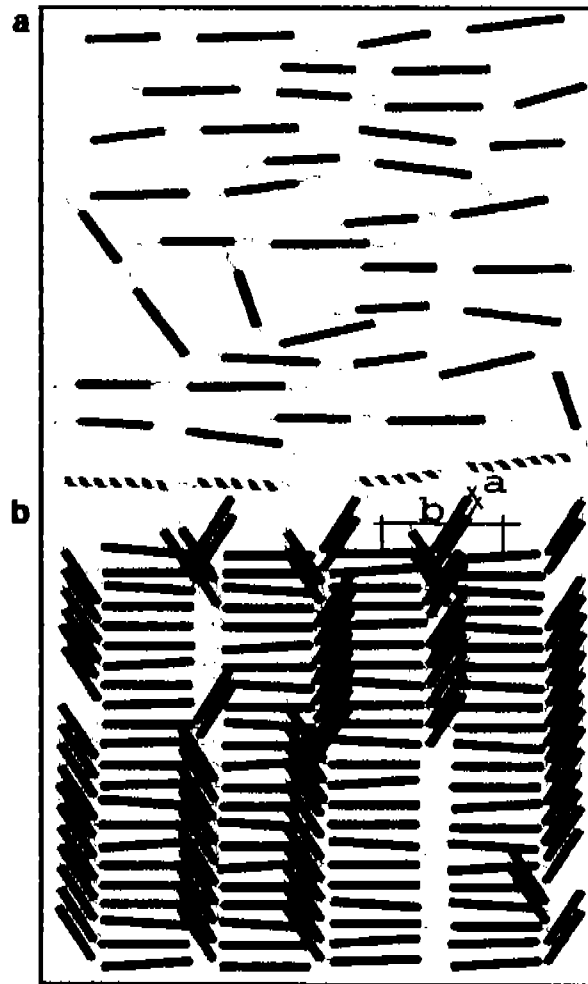
### **Modelo de la apolipoproteína AII**

Para la apo AII se ha propuesto un modelo para representar la orientación de las hélice  $\alpha$  en la fase *L* y en la fase *LC*. Durante la fase *L* a una presión lateral de 20 mN/m las hélice  $\alpha$  se encuentran dispuestas de manera paralela sin un orden de largo alcance, colocadas con su eje largo paralelo a la superficie del agua y con la cara hidrofílica interaccionando con la mica, mientras que la cara hidrofóbica queda expuesta hacia el aire (Figura 30a). En la monocapa de la figura 25 de MFA se pueden observar líneas poco ordenadas cuyo grosor es del orden de 10.9 Å, la cual corresponde con el grosor de las dos cadenas polipeptídicas de la apo AII.

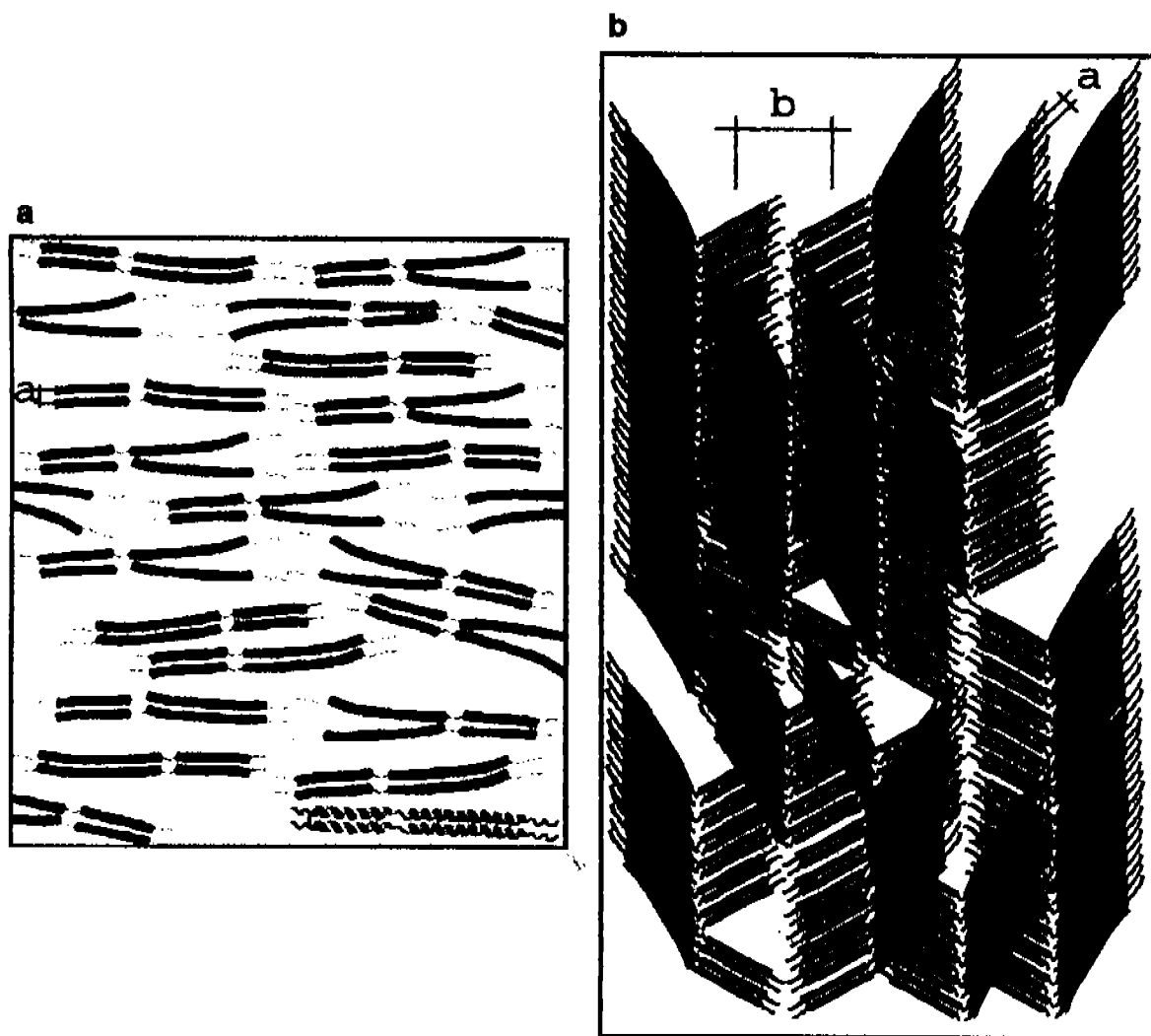
Durante la fase *LC* un segmento de cada cadena polipeptídica de la apo AII se desprende de la superficie del agua y los otros segmentos se encuentran asociadas en la interfase aire/agua. En la figura 30b se muestra una representación de la organización que adquieren las moléculas durante la fase *LC*. En la figura 26 de MFA se observa como la distancia entre centro-centro de los dominios oscuros es del orden de 35.2 Å, esto corresponde con la hélice  $\alpha$  corta (7-27) con una longitud de 31.5 Å, mientras que la hélice  $\alpha$  grande (32-67) se orienta hacia el aire con una longitud de 54 Å. La región helicoidal corta presenta un valor de  $\mu H$  de 0.49 kcal/mol por residuo que le permite interaccionar fuertemente con la superficie del agua, mientras que la región helicoidal que se orienta hacia el aire presenta un valor de 0.34 kcal/mol por residuo (Figura 30b).



**Figura 28.** Imagen de MFA de una monocapa de apo AII transferida en la fase *L* sobre mica hidrofóbica. La línea vertical que cruza la imagen, muestra la distancia horizontal entre los dominios grises con un diámetro de 1.6 nm.



**Figura 29.** Modelo para la monocapa de apo CI en la interfase aire/agua. a) Disposición de la apo CI en la fase L. b) Disposición de la apo CI en la fase LC.



**Figura 30.** Modelo para la monocapa de apo AII en la interfase aire/agua.  
 a) Disposición de la apo AII en la fase L. b) Disposición de la apo AII en la fase LC.

### **Referencias**

119. Bourdieu L, Daillant J, Chatenay D, Braslau A, Colson D. Buckling of polymerized monomolecular films. *Phys Rev Lett*. 1994. **72**: 1502-1505.
120. Campos J, Eskilsson K, Nylander T, Svendsen A. On the interaction between adsorbed layers of monoolein and the lipase action on the formed layers. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2002. **26**: 172-182.
121. Galván-Miyoshi J, Ramos S, Ruiz-García J, Castillo R. Localized oscillations and Fraunhofer diffraction in crystalline phases of a monolayer. 2001. **115**: 8178-8184.
122. Ohnishi S, Ishida T, Yaminsky VV, Christenson HK. Characterization of Fluorocarbon Monolayer Surfaces for Direct Force Measurements. *Langmuir*. 2000. **16**: 2722-2730.
123. Ruiz-García J, Moreno A, Brezesinski G, Mohwald H, Mas-Oliva J, Castillo R. Phase Transitions and Conformational Changes in Monolayers of Human Apolipoproteins CI and AII. *J Phys Chem B*. 2003. **107**: 11117-11124.
124. Wood J, Sharma R. How Long is the long-range hydrophobic attraction?. *Langmuir*. 1995. **11**: 4797-4802.
125. Wood J, Sharma R. Preparation of a robust hydrophobic monolayer on mica. *Langmuir*. 1994. **10**: 2307-2310.
126. Xiao XD, Liu G, Charych DH, Salmeron M. Preparation, Structure, and Mechanical Stability of Alkylsilane Monolayers on Mica. *Langmuir*. 1995. **11**: 1600-1604.



## Monolayers of Apolipoprotein AII at the Air/Water Interface

J. Mas-Oliva,<sup>1</sup> A. Moreno,<sup>2</sup> S. Ramos,<sup>3</sup> J. Xicohtencatl-Cortes,<sup>1</sup>  
J. Campos,<sup>3</sup> and R. Castillo<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Instituto de Fisiología Celular, UNAM, P.O. Box 70-243, México, D.F. 04510*

<sup>2</sup>*Instituto de Química, UNAM, México, D.F. 04510*

<sup>3</sup>*Instituto de Física, UNAM, P.O. Box 20-364, D.F. 04510*

**Summary.** Lipoproteins in plasma present the property to exchange lipids between themselves and also with different types of cells. Associated proteins known as apolipoproteins give these particles their lipid exchange characteristics, and also provide a way to control their directionality and ability to interact with receptors located at the surface of cells. In order to provide information on the three dimensional structure of apolipoprotein AII (apoAII), an important constituent of high density lipoprotein particles (HDL), we have studied monolayers of this apolipoproteins combining Langmuir techniques with Brewster Angle Microscopy and Atomic Force Microscopy. We describe the gas/liquid-phase transition in this protein and a phase transition between two condensed phases at high lateral pressures. This transition corresponds to a conformational change of the protein due to the desorption of one of its  $\alpha$ -helix segments from the subphase. This result suggests that changes in lateral pressure along changes in shape, size, and composition of HDL particles, might affect the conformation of apolipoproteins including apoAII interacting with the surface of the lipoprotein. This type of conformational change in apoAII might be involved with the exchangeability process as observed with this class of apolipoproteins, as well as with protein recognition by specific receptors at the cell surface.

**Key words:** Apolipoprotein AII, Protein Monolayers, and HDL.

### 1. INTRODUCTION

Important molecules such as cholesterol, triglycerides and phospholipids that are mostly water insoluble, are transported in plasma and mobilized to and from cells

Corresponding author: J. Mas-Oliva, E-mail: jmas@fisiol.unam.mx.

in the form of lipoprotein particles. Together with these lipids, associated proteins known as apolipoproteins represent the molecules that apparently give lipoproteins directionality and the ability to interact with receptors in the surface of cells (1,2). Several of these apolipoproteins present the property to exchange between the different classes of lipoproteins (apoAI, AII, AIII, CI, CII, CIII and E), while others form part of the particle as fixed proteins (apoB48 and B100) (3,4). Although this characteristic is well documented, the specific circumstances that define this behavior are still not well understood.

Since apolipoprotein transfer between lipoprotein particles can critically modify their metabolism, and therefore their fate, the way lipid molecules might get absorbed or released from cells, as well as the chemical and physical properties that control this transfer have become critical in understanding lipoprotein metabolism. In general terms, while low density lipoprotein particles (LDL) and very low density lipoproteins (VLDL) have been given a pro-atherogenic role, high density lipoproteins (HDL) have been recognized as an anti-atherogenic factor (5). Although this characteristic behavior has been recognized for some time, the molecular explanation to this phenomenon is still lacking. Most probably its explanation resides in the way the different apolipoproteins are structured when associated to the surface of lipoprotein particles (6-8). As an example of this behavior, we can examine the change in size and shape of HDL particles from the time these are formed as nascent flat-discoidal particles; to the time they reach maturity as spherical particles (9). In the latest stage, HDL particles mainly containing apoAI, apoAII and apoCI, have been loaded with cholesterol mostly from endothelial cells. After the intervention of a good number of several plasma factors, HDL particles only in the spherical and not in the discoidal form get ready to be taken up by the liver and adrenal glands for bile acid and steroid hormone synthesis respectively (5). Therefore, what is the signal employed by the system that allows only spherical HDL particles to be recognized by the putative receptor and taken up by the liver cells? Although changes in size and shape that dramatically might affect apolipoprotein conformation have remained a key feature for understanding recognition of HDL particles by the liver, the experimental approach to study this phenomenon is just emerging. Recently, our group has started to study the surface properties of the exchangeable family of apolipoproteins measuring as monolayers, their surface pressure and adsorption isotherms at the air/water interface (10-12).

To provide information on the three-dimensional structure of exchangeable apolipoproteins in the form of monolayers, we have combined Langmuir Techniques with Brewster Angle Microscopy (BAM) and Atomic Force Microscopy (AFM). Our studies have focused on the structural changes observed during lateral compression and decompression of apoAII monolayers, trying to mimic what it might be happening at the surface of HDL particles, from the time of synthesis as discoidal nascent particles to the time of uptake by the liver and adrenal glands as spherical particles. The result of our studies suggests that changes in lateral pressure correlated to changes in shape, size and composition of HDL particles, might affect the conformation of apolipoproteins interacting with the lipoprotein surface. We

propose that specific conformational states associated with the absorption or desorption of a segment of these apolipoproteins at the surface of HDL particles, might be involved in the exchangeability process as well as in molecule recognition by specific receptors at the surface of cells specialized in taking up these type of mature HDL particles.

## 2. METHODS

Lyophilized apoAII isolated from its natural source, was purchased from Sigma Chem. Co. (San Louis, MO). Protein solutions were always filtered using 0.22  $\mu\text{m}$  membrane filters before carrying out the experiments. The protein concentration was determined according to the equation:  $A = \epsilon l C$ . Here,  $A$  is sample absorbance;  $l$  is the path length;  $\epsilon$  is the molar absorption coefficient and  $C$  = protein concentration.  $\epsilon$  at 280 nm was obtained according to the procedure described by Pace (13).

ApoAII was solubilized in a buffered solution, and spread onto a subphase of a phosphate buffered solution (20 mM, pH 8.0) prepared with ultrapure water (Nanopure-UV) containing 3.5 M KCl (Baker, Mexico). The different apolipoprotein spreading solutions were diluted to a final concentration ca. 0.2 mg/ml. It is important to note that before preparing the KCl solution, the KCl salt was heated for 4 hours at 300°C to prevent spurious organic compounds in the surface of the subphase. Monolayers were prepared on a computerized Nima Langmuir-Blodgett trough (TKB 2410A, Nima Technology Ltd., England) using a Wilhelmy plate to measure the surface pressure,  $\Pi = \gamma_0 - \gamma$ , i.e., the surface tension difference of the clean subphase and that of the protein covered subphase. The cleanliness of the subphase can be assured making a compression of the barriers without protein and obtaining a negligible pressure rise ( $\Pi < 0.1 \text{ mN/m}$ ).

The trough was isolated from vibrations using a pneumatic tube incorporated into a steel base. The barriers are made of PTFE fitted with stiffening bars defining a working circular area, starting at 1000  $\text{cm}^2$ . All experiments were carried out in a dust-free environment at 25°C. Temperature in the trough was kept constant at 25°C with the aid of a water circulation bath. The speed of compression was in the order of 50  $\text{cm}^2/\text{min}$ . This compression rate corresponds to 145,  $\text{\AA}^2/\text{molec. min.}$ , for apoAII.

BAM observations were performed in a BAM1 Plus (Nanofilm Technologie GmbH, Germany), with a spatial resolution ca. 4  $\mu\text{m}$ . Here, the interface is illuminated at the Brewster incidence ( $\sim 53^\circ$ ) with a polarized laser beam from a He-Ne laser. A microscope receives the reflected beam that is analyzed by a polarization analyzer, and the signal is received by a CCD video camera to develop an image of the monolayer.

For secondary structure predictions, the computer program employed was based on the Profile Network Prediction Heidelberg method (PHD version 5.94-317, Heidelberg). This program consist of a neural network approach that averages several independently trained networks before making the final assessment with an average for successful prediction above 72%.

Mica surfaces were made hydrophobic with a Langmuir-Blodgett deposit of octadecyltriethoxysilane (OTE) according to the procedure developed by Wood and Sharma (14,15). A film of prepolymerized OTE was spread onto a water subphase, acidified with HCl to obtain *pH* 2. After spreading the OTE solution, we waited until the pressure drop was negligible; typical waiting times were in the range of 15 min. The degree of polymerization of the monolayer was observed with the BAM. We compressed and deposited the film on mica, at a constant lateral pressure at 20–25 mN/m (*T* = 23°C). The mica was previously activated by a radio frequency-generated Air/H<sub>2</sub>O plasma (2 min. at -30 W, 100 mTorr, in a Harrick Plasma Cleaner, PDC-23G, New York). After deposition, the hydrophobic mica surfaces were baked and annealed for 2 hours in a vacuum oven (120°C, 100 mTorr) before use.

The transferred protein monolayers were scanned with a NanoScope IIIa SFA (Digital Instruments, California, USA.) using a 15 × 15 μm<sup>2</sup> scanner. Preliminary scanning measurements in contact mode and deflection mode were made at 2.5 Hz using Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> tips using a typical force constant of 0.3 Nm<sup>-1</sup>. The contact atoms mode was used in flat regions of the covered mica in order to improve data and image acquisition using reduced scan rates of 1 Hz. All images were analyzed with the Digital Instruments software.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

As an example of an apolipoprotein that forms an important part of HDL particles and therefore plays a significant role in HDL metabolism, we shall concentrate with our findings related to the study of apoAII. Although apoAII is considered a pro-atherogenic molecule since displaces apoAI from the surface of HDL particles, the mechanisms that control and modulate this process are still unknown. ApoAII is composed by 77 aminoacids and present two well defined amphipathic α-hélices between residues 7–27 and 32–67 (Figure 1). Both α-helix residues present high hydrophobic moment (μ<sub>H</sub>) values with 0.49 and 0.34 kcal/mol residue respectively. These values give us a good idea of the amphipathicity of both regions, since values above 0.20 kcal/mol residue are considered good candidates to form amphipathic helices (16). The primary structure of apoAII has also shown a high homology (55%)

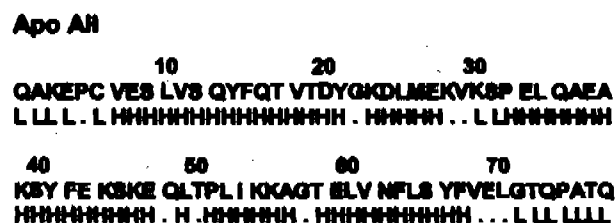


Figure 1. Secondary structure prediction of apoAII according the PHD method. H = α-helix, L = loop, and . = no prediction for the segment.

with the murine senile amyloid protein (AS<sub>Sam</sub>). Since it has been reported that apoAII might be considered a putative precursor of AS<sub>Sam</sub>, it has been suggested that apoAII might be also involved in amyloidogenic processes such as in Alzheimer disease (17). Therefore, in biomedicine it has become crucial to understand the way apolipoproteins change their structure, and as a physiological response regulate not only lipoprotein metabolism, but also the fate of related proteins associated for instance to the physiopathology of the central nervous system.

As recently confirmed for the human apoCI (10–12), apoAII although freely soluble in water, remains at the air/water interface in a Langmuir trough when spread directly onto a 3.5M KCl subphase solution. As shown in figure 2, an isotherm obtained at 25°C and pH 8.0 shows several well defined features: a) starting at a very low surface area density, a region of  $\pi \sim 0$  mN/m is found. This region ends at approximately  $a = 5000 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$ . Although BAM observations could not show domains of condensed phase, this behavior corresponds to a gas/condensed phase transition (Figure 3). b) After lateral pressure increases, a typical low compressibility phase appears (Figure 2). During this period of low compressibility, BAM observations did not show any well defined domains. Nevertheless, we could immediately notice that defects on the monolayers move at a slower pace than the ones found in the gas/condensed phase coexistence. c) As pressure continues to build up, the apoAII monolayer presents a second phase transition just before it collapses at  $\pi \sim 32$  mN/m (Figure 4). When the condensed phase ( $L_1$ ) is compressed, a wide kink is found around  $\pi \sim 30\text{--}35$  mN/m and a  $\sim 1000\text{--}2500 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$ . This phenomenon exemplifies the classical behavior of a phase transition between two condensed phases ( $L_1/L_2$ ). Furthermore, it was confirmed that this phase transition is reversible, since several compression/decompression cycles showed negligible changes in  $\pi$ . In the same way, when the monolayers were left untouched at  $\pi \sim 30$  mN/m for an hour, changes in lateral pressure were not modified over 3 mN/m. Although the different compression/decompression assays did not exactly retrace on top of each other, after each decompression, the isotherm presented the same characteristics as the very first one obtained. The small loss in area could be explained in a negligible fashion as a very small loss of protein from the surface. BAM observations showed that under these conditions, the monolayer changed from a tenuous gray to a bright gray covering big domains and some times the entire field of view. The monolayer collapses at the end of the compression at  $\pi \sim 47$  mN/m and a  $\sim 500 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$  (Figure 5).

AFM is an emerging technology that can be used for sizing of protein to a surface. In the optimal condition, the AFM resolves single atoms (0.2 nm resolution) (18,19), nevertheless under more usual conditions, the resolution could be 2–25 nm. The extremely good signal-to-noise ratio for the AFM allows direct visualization of single protein molecules without the use of contrast enhancing agents (20,21). Therefore, we have developed a method to study apolipoprotein monolayers in Langmuir-Blodgett arrays by AFM. ApoAII monolayers were transferred on mica at a low speed ( $1.0 \text{ mm min}^{-1}$ ) and scanned in the contact mode at 2.5 Hz using  $\text{Si}_3\text{N}_4$  tips with a constant force of  $0.3 \text{ Nm min}^{-1}$ . Monolayers were initially transferred in the

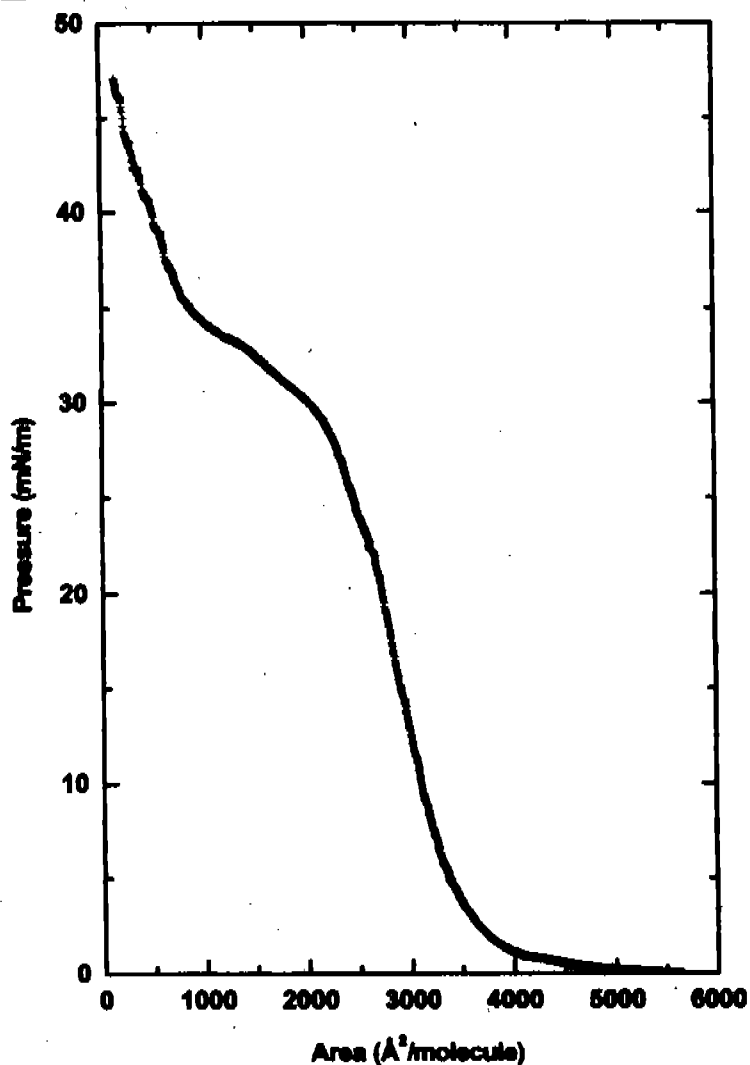
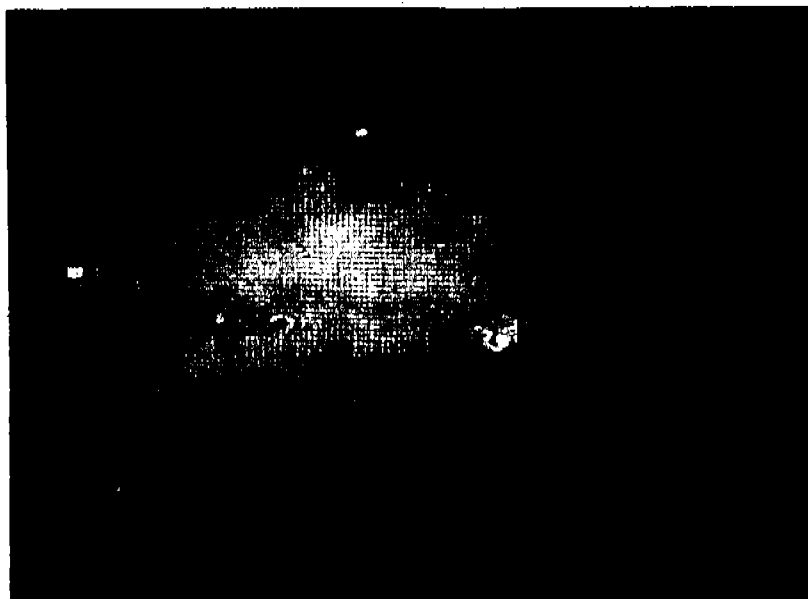


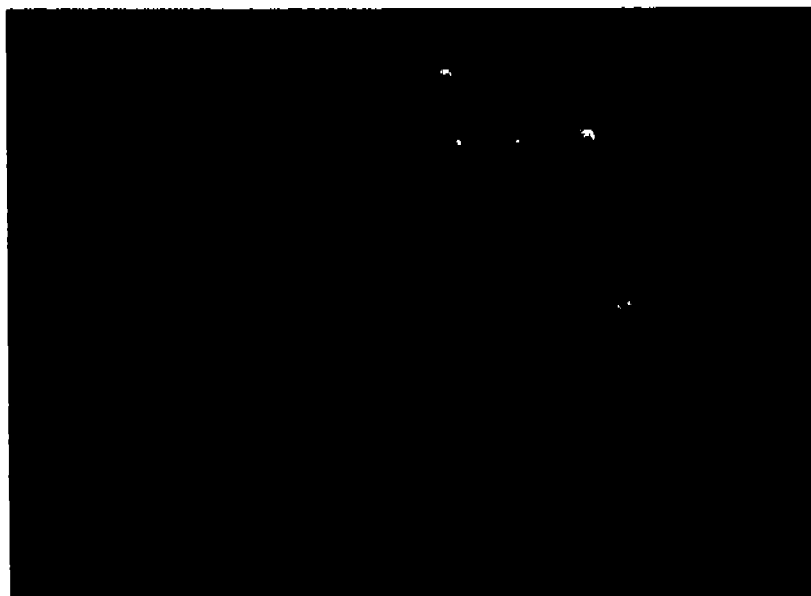
Figure 2. Typical isotherm of apoAII. The assays were performed at 25°C, a protein concentration of 0.3 mg/ml and a compression speed of 50 cm<sup>2</sup>/min.

liquid ( $L_1$ ) phase at  $\pi \sim 20$  mN/m far from the pressure at which the phase transition takes place (Figure 6). The image shows an arrangement of molecules in the form of rows. The average width for these rows corresponds to 17 Å, measurement that correlates well with the width of apoAII in a dimeric form. These rows present a continuous image that is in agreement with the molecule entirely lying on the



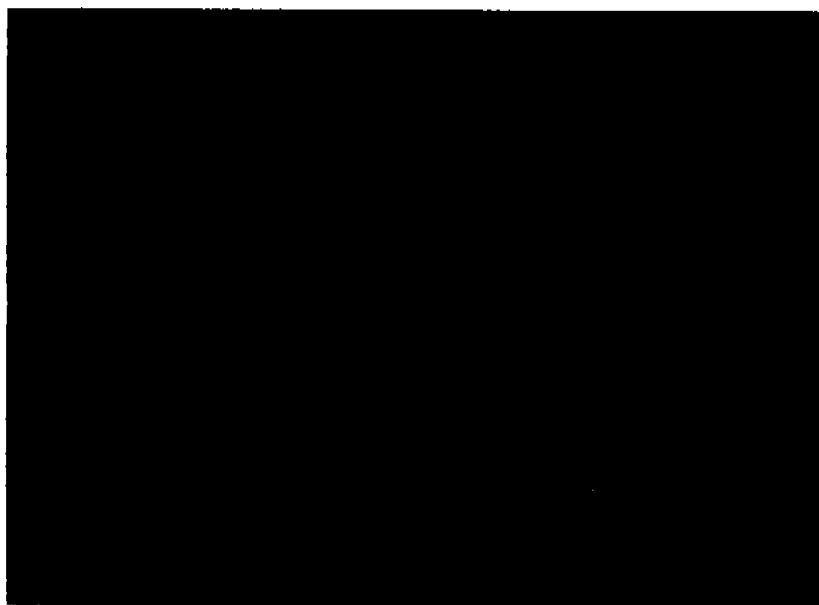
---

**Figure 3.** BAM image of the apoAII monolayer just before the  $L_1/L_2$  transition.



---

**Figure 4.** BAM image of the apoAII monolayer at  $\Pi = 30\text{--}35\text{ mN/m}$  and an area of  $\sim 1000\text{--}2000\text{ \AA}^2/\text{molec.}$

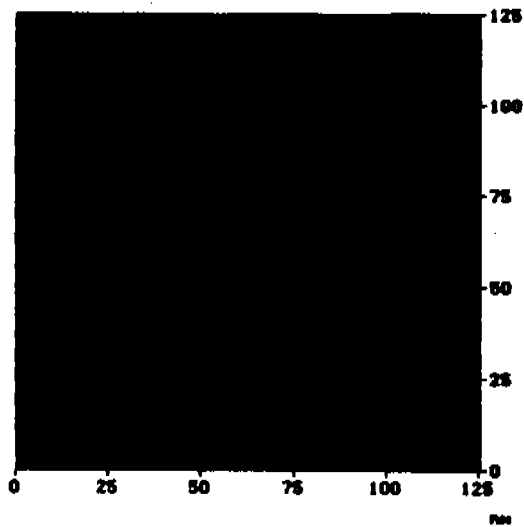


**Figure 3.** BAM image of the apoAII collapsed monolayer at  $\Pi \sim 47 \text{ mN/m}$  and an area of  $\sim 500 \text{ \AA}^2/\text{molec.}$

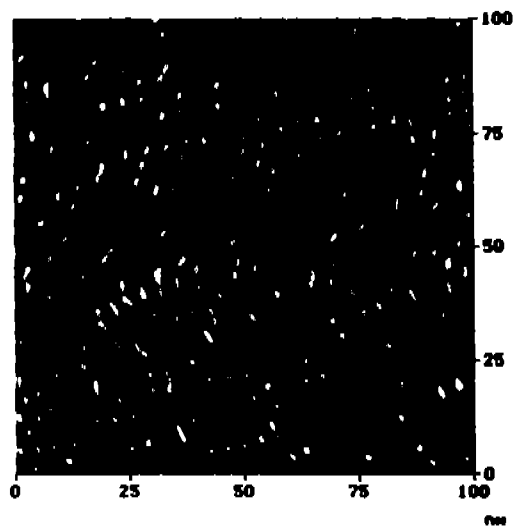
surface of the interface. In contrast, if the monolayers are transferred to mica in the liquid-crystalline (LC) phase at  $\pi \sim 33 \text{ mN/m}$ , just before the phase transition shown in the isotherms takes place, the images appear to be quite different. Here, elongated domains with high contrast are observed (Figure 7). In accordance to our measurements, these domains that get lifted from the background correspond to one of the  $\alpha$ -helix segments of apoAII arranged as a dimer.

Since we wanted to explore the behavior of apoAII when placed on a hydrophobic surface, apoAII monolayers were transferred in the  $L_1$  phase on mica pre-treated with OTE. AFM images show that under these conditions the moithinules also organize themselves in rows with measurements consistent with the width of single  $\alpha$ -helices ( $5\text{--}7 \text{ \AA}$ ) (Figure 8). Under these conditions, when placed on hydrophobic surfaces, apoAII appears to separate well both  $\alpha$ -helices forming the dimer. Since apoAII corresponds to a dimer bonded by a disulfide bonds at position 6 of both amino ends of the molecule, the image also appears to show such bonding. Although the arrangement between molecules seems to be more disordered than images obtained from hydrophilic surfaces, employing hydrophobic surfaces, the molecules arrange between themselves in parallel rows. These monolayers placed on OTE covered mica were transferred at  $20\text{--}25 \text{ mN/m}$ . Since the hydrophobic halves of apoAII in this condition most probably are facing the mica surface, it was not possible to perform experiments increasing the surface pressure. This is based on the

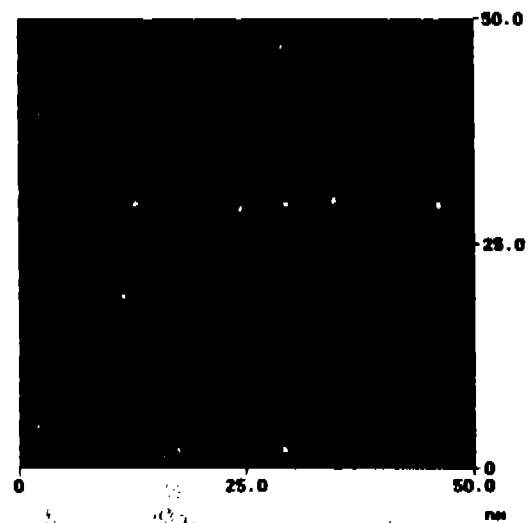




**Figure 6.** Atomic Force Microscopy image of an apoAII monolayer transferred to the hydrophilic surface of mica. A transfer speed of 1 mm/min was employed and  $\Pi \sim 20$  mN/m.



**Figure 7.** Atomic Force Microscopy image of an apoAII monolayer transferred to the hydrophilic surface of mica. A transfer speed of 1 mm/min was employed and  $\Pi \sim 33.7$  mN/m.



**Figure 8.** Atomic Force Microscopy image of an apoAII monolayer transferred to the hydrophobic surface of mica covered with octadecyltriethoxysilane (OTE). The transfer speed of OTE to cover freshly cleaved mica was carried out at 1 mm/min and  $\Pi \sim 25$  mN/m. The transfer speed for the protein on mica previously covered with OTE corresponded also to 1 mm/min and  $\pi \sim 20$  mN/m.

apoAII in this condition most probably are facing the mica surface, it was not possible to perform experiments increasing the surface pressure. This is based on the conformational arrangements described above using hydrophilic surfaces that would destroy these monolayers when placed on a hydrophobic surface. Nevertheless, our model having the two alpha helices laying down parallel to the water surface has been confirmed.

Since the way these exchangeable apolipoprotein molecules move between lipoprotein particles has remained an open question, based in our past and present observations, a proposal can be made. This proposal is based on the physicochemical properties of amphipathic  $\alpha$ -helices, the number of apolipoprotein copies present on the surface of lipoproteins, and a theoretical decrease in lateral surface pressure given by changes in volume and/or shape of lipoproteins. First of all, HDL particles synthesized by hepatocytes and enterocytes as small disk-shaped particles, contain relatively low amounts of free cholesterol, no cholesterol esters, and appear to be rich in apolipoproteins. These apo proteins making up to 55% of the total mass of these particles, contain at their surface a mixture of apolipoproteins (CI, CII, CIII, AI; AII, D and E), as well as the cholesterol esters transfer protein (CETP) and the enzyme lecithin-cholesterol-acyl-transferase (LCAT). This latest enzyme located at the surface of nascent discoidal HDL particles converts cholesterol and lecithin taken up from chylomicron and very low density lipoprotein remnants (remnant VLDL), to cholesteryl esters. Therefore, they begin to form a core, transforming the disk-shaped nascent HDL to a mature spherical HDL particle. In such a case, due to the size and rich protein composition of nascent HDL particles, lateral pressure between the different apolipoproteins and accessory proteins could be thought to be high, and only decreases in parallel to changes in size and form that take place during the permanence of HDL in circulation as spherical particles. Theoretical calculations employed to measure the difference in size of nascent and mature particles, together with the area values obtained from the shadows of  $\alpha$ -helices contained in the different apolipoproteins projected at the surface of HDL, allow us to speculate that lateral pressure between proteins at the surface of HDL particles might be very different in both conditions. Such a proposal could be related to the one suggested for apoAI during its interaction with discoidal or spheroidal HDL particles (22), or when apoCI modulates the interaction of apoE with  $\beta$ -migrating VLDL particles (23).

From our study it can be concluded that adsorption of apolipoproteins onto a monolayer is of interest; first as an approach to study protein/protein interactions, and second to analyze their behavior as exchangeable proteins. Based on the concept that the presence of amphipathic  $\alpha$ -helices might be considered a key factor in defining the physiological behavior of exchangeable apolipoproteins, we could start to have a clearer picture of the mechanisms that facilitate the exchange of these proteins between lipoproteins, as well as the structural changes related to their physiological function. Since there is still a limited knowledge about the molecular forces and interactions that determine the surface properties of exchangeable apolipoproteins, one of our next goals will be to study the surface pressure of both disk-shaped

spheroidal HDL particles (22), or when apoCI modulates the interaction of apoE with  $\beta$ -migrating VLDL particles (23).

From our study it can be concluded that adsorption of apolipoproteins onto a monolayer is of interest; first as an approach to study protein/protein interactions, and second to analyze their behavior as exchangeable proteins. Based on the concept that the presence of amphipathic  $\alpha$ -helices might be considered a key factor in defining the physiological behavior of exchangeable apolipoproteins, we could start to have a clearer picture of the mechanisms that facilitate the exchange of these proteins between lipoproteins, as well as the structural changes related to their physiological function. Since there is still a limited knowledge about the molecular forces and interactions that determine the surface properties of exchangeable apolipoproteins, one of our next goals will be to study the surface pressure of both disk-shaped HDL particles and spherical HDL particles in order to better correlate the results here obtained with their actual physiological implications here also proposed.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge financial support from CONACyT (Mex), and DGAPAUNAM (Mex). The technical assistance of biologist Blanca Delgado and the secretarial help of Mrs. Ma. Elena Gutiérrez are gratefully acknowledged.

#### REFERENCES

1. Fielding PE, Fielding CJ. 1996. Dynamics of Lipoprotein Transport in the Circulatory System. In: *Biochemistry of Lipid, Lipoproteins and Membranes* (Vance DE, Vance J eds.) pp. 427-458.
2. Eisenberg S. 1990. Metabolism of apolipoproteins and lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 1:205-215.
3. Weisgraber KH, Pitas RE, Mahley RW. 1995. In: *Atherosclerosis* (Wodford PD, Davignon J, and A Sniderman eds. Elsevier Science, pp. 670-674.
4. Purcell-Huynh DA, Farese RV, Johnson DE, Flynn LM, Pierot V, Newland DL, Linton ME, Sanan DA, Young SG. 1995. Transgenic mice expressing high levels of human apolipoprotein-B develop severe atherosclerotic lesions in response to a high fat diet. *J Clin Inv* 95:2246-2257.
5. Maiorano JN, Davidson WS. 2000. The orientation of helix 4 in apolipoprotein A-I-containing reconstituted high density lipoproteins. *J Biol Chem* 275:(23) 17374-17380.
6. Wlodawer A, Segrest JP, Chung BH, Chioveti RJ, Weinstein JN. 1979. High-density lipoprotein recombinants: evidence for a bicycle tire micelle structure obtained by neutron scattering and electron microscopy. *FEBS Lett* 104:231-235.
7. Tall AR, Small DM, Deckelbaum RJ, Shipley GG. 1977. Structure and thermodynamic properties of high density lipoprotein recombinants. *J Biol Chem* 252:4701-4711.
8. Segrest JP, Joanes MK, Klon AE, Shekhlai CJ, Hellinger M, De Loof H, Harvey SC. 1999. A detailed molecular belt model for apolipoprotein A-I in discoidal high density lipoprotein. *J Biol Chem* 274:31755-31758.
9. Rys KA, Clay MA, Barter PJ. 1999. Remodelling of high density lipoproteins by plasma factors. *Atherosclerosis* 145(2):227-238.
10. Bolaños-García V, Mas-Oliva J, Ramos S, Castillo R. 1999. Phase transitions in monolayers of human apolipoprotein CI. *J Phys Chem B* 103:6236-6242.
11. Bolaños-García V, Ramos S, Castillo R, Xicohtencatl-Cortés J, Mas-Oliva J. 2001. Monolayers of apolipoproteins at the air/water interface. *J Phys Chem B* 105:5757-5765.
12. Ruiz-García J, Moreno A, Brezesinski G, Mährwald H, Mas-Oliva J, Castillo R. (Submitted).
13. Pace CN, Vajdos F, Fee L, Grimalley G, Gray T. 1995. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Prot Sci* 4:2411-2423.

14. Wood J, Sharma R. 1994. Preparation of a robust hydrophobic monolayer on mica. *Langmuir* 10:2307-2310.
15. Wood J, Sharma R. 1995. How long is the long-range hydrophobic attraction? *Langmuir* 11(12): 4797-4802.
16. Bolaños-García V, Soriano-García M, Mas-Oliva J. 1997. CETP and Exchangeable Apoproteins. Common Features in Lipid Binding Activity. *Mol and Cell Biochem* 175:1-10.
17. Yonezu T, Higuchi K, Tsunawawa S, Takagi S, Sakiyama F, Takada T. 1986. High homology is present in the primary structures between murine senile amyloid (AS<sub>SM</sub>) and human apolipoprotein A-II. *FEBS Lett* 203:149-152.
18. Glas C, Pittman RC, Civen M., Steinberg D. 1985. Uptake of high-density lipoprotein-associated apoprotein A-I and cholesterol esters by 16 tissues of the rat in vivo and by adrenal cells and hepatocytes in vitro. *J Biol Chem* 260:744-750.
19. Müller DJ, Heyman JB, Oosterhek F, Moller C, Gaub H, Buldt G, Engel A. 2000. Atomic force microscopy of native purple membrane. *Biochim Biophys Acta* 1460:27-38.
20. Giessibl FJ. Atomic resolution of the silicon (111)-(7x7) surface by atomic force microscopy. *Science* 267:68-71.
21. Shao Z, Mou J, Czajkowski DM, Yang J, Yuan J-Y. 1996. Biological atomic force microscopy: What is achieved and what is needed. *Adv Phys* 45:1-86.
22. Fielding CJ, Fielding PE. 1995. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res* 36:211-228.
23. Weisgraber KH, Mahley RW, Kowal RC, Herz J, Goldstein JL, Brown MS. 1990. Apolipoprotein C-I modulates the interaction of apolipoprotein E with  $\beta$ -migrating very low density lipoproteins ( $\beta$ -VLDL) and inhibits binding of  $\beta$ VLDL to low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* 265:22453-22459.

***RESULTADOS III***

### ***Descripción de las monocapas de Langmuir de fosfolípidos***

En una isoterma típica de una monocapa de fosfolípido se encuentran varias secuencias de fases en dos dimensiones (2D) con incrementos de densidad, comenzando con una fase gaseosa (G), una fase líquida expandida (L), una fase condensada con un orden de inclinación orientacional (TC) y una fase ordenada con una inclinación posicional (UC) (Kanger y col., 2003). Las fases TC y UC se forman primeramente como líquido sólido y condensado, aunque esta última fase no se presenta en el caso particular de la dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC). La inclinación de las cadenas hidrocarbonadas es del orden de entre 29-37°C en la fase TC (Krasteva y col., 2001) y la cabeza polar con sus tres grupos metilos es de ~45 Å, la cual dispone de un arreglo de las colas en forma vertical. En fosfolípidos, las fases con cadenas libres de rotación a lo largo de los ejes moleculares pueden no existir, ya que el acoplamiento de las dos cadenas previene la libre rotación. El movimiento lateral de una molécula requiere del movimiento de las dos cadenas, impidiendo el papel de reducción de libertad traslacional comparado a los grados internos de libertad de una molécula. La orientación y posición de las cabezas polares pueden también involucrar un orden, mientras que las interacciones entre las cabezas polares pueden ser lateralmente anisotrópicos. Experimentos con rayos X han revelado el orden que guardan las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos; sin embargo, el orden que guardan sus cabezas polares aún no se ha determinado. En los últimos años se han realizado varios estudios utilizando monocapas de DPPC que involucran transiciones de fase (Albrecht y col., 1978; McConnell 1991), fases moduladas (McConnell 1991), interacciones (Nadi y Vollhardt 2002), rugosidades (Schief y col., 2000), estructuras quirales (Weiss y McConnell 1985; Amador Kane y col., 2000a; Kruger y Lösche 2000) y mezclas con diferentes compuestos (Krasteva y col., 2001; Kruger y Lösche 2000; Weiss y McConnell 1985; Wüstneck y col., 2000; Amador Kane y col., 2000b; Sundaram y col., 1998; Fainerman y col., 199). Resulta verdaderamente novedoso realizar análisis de adsorción y penetración de proteínas en monocapas de DPPC y observar sus efectos durante la fase condensada tanto de manera experimental como teóricamente.

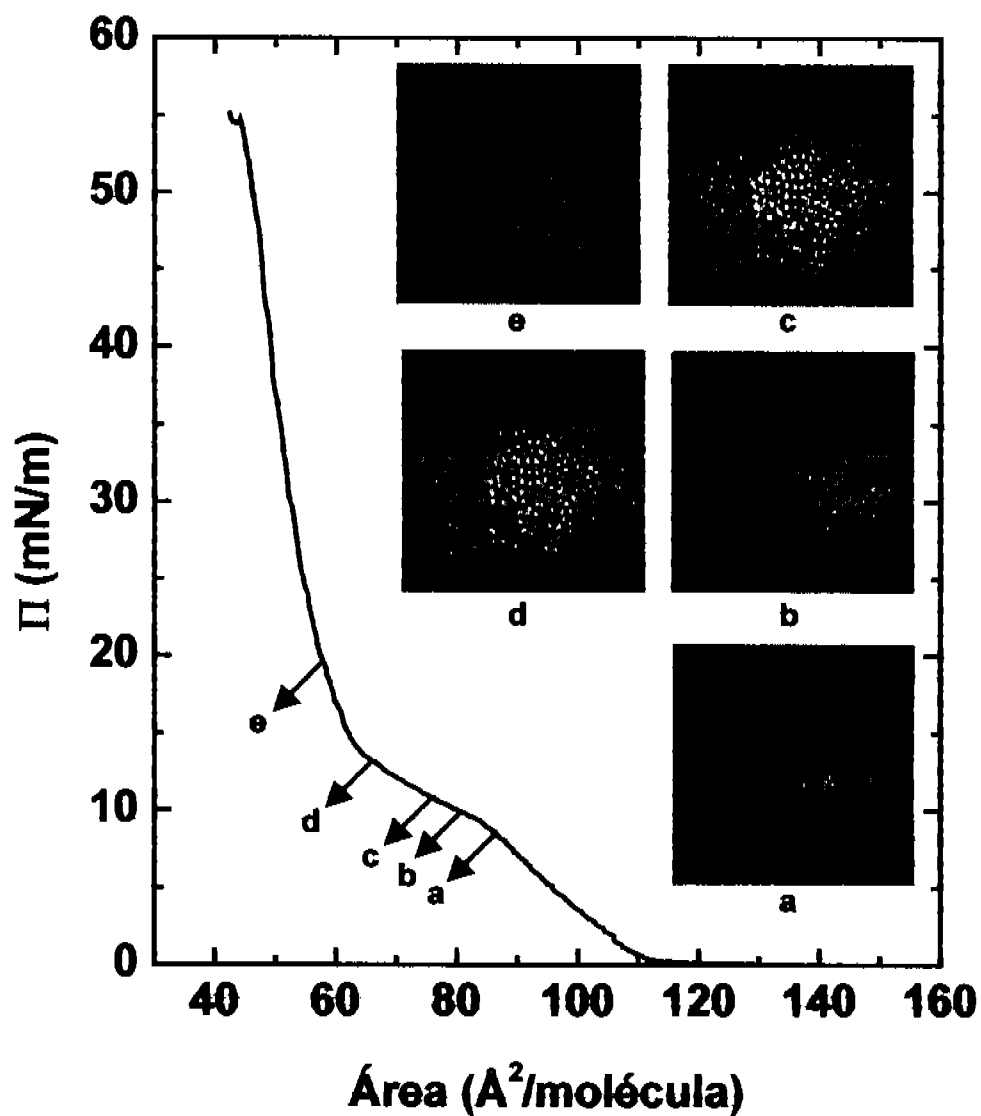


Figura 31. Isotherma típica  $\Pi$  vs  $a$  para la monocapa de DPPC dispersada sobre un amortiguador de fosfatos (pH 8.0 y 20 mM), a 25°C. Los insertos muestran las imágenes de MAB obtenida a diferentes presiones laterales.

### **Isotermas y observaciones con MAB de la monocapa de DPPC**

La figura 31 presenta una isoterma típica de la monocapa de DPPC en 25°C dispersada sobre una solución de fosfatos de sodio 20 mM, pH 8.0. A lo largo de esta isoterma se observan dos transiciones de fase definidas ya reportadas: a) Transición de fase *G/L* a  $\Pi \sim 0$  mN/m y  $a \sim 117$  Å<sup>2</sup>/molécula; b) Transición de fase *L/LC*  $\Pi \sim 9-12$  mN/m y  $a = 65 \sim 85$  Å<sup>2</sup>/molécula. Durante esta transición de fase aparecen pequeños dominios que se unen para formar grandes estructuras que son fácilmente observados con MAB (insertos de la figura 31). Sin embargo, la resolución de las imágenes obtenidas con MAB no permiten observar claramente la característica de tres dominios organizados reportados en monocapas de DPPC. Las formas de estos dominios están determinadas principalmente por tres contribuciones a la energía libre: tensión lineal, interacción dipolar y contribución quiral (Weiss y col., 1985). A una presión lateral de  $\Pi \sim 30$  mN/m la monocapa presenta una textura con poco contraste, y a un incremento mayor de  $\Pi \sim 55$  mN/m y  $a \sim 45$  Å<sup>2</sup>/molécula se observa un colapso típico.

### **Penetración de apolipoproteínas a monocapas de DPPC**

Cuando las apolipoproteínas se dispersan por debajo de la monocapa de DPPC previamente formada mediante el método de inyección, éstas penetran a la monocapa de DPPC después de un tiempo definido.

Las figuras 32 y 33 muestran algunos ejemplos de los tiempos utilizados para alcanzar un estado estacionario después de la inyección de las apolipoproteínas. En estas figuras se muestran curvas de presión lateral *versus* tiempo y se observa como la presión se incrementa hasta alcanzar una estabilización asintótica, donde no hay más penetración de moléculas de apolipoproteínas en la monocapa de DPPC. Es evidente que en cada ensayo se presenta un tiempo crítico en los aumentos de presión, debido al lugar y forma específica donde la proteína fue depositada. Cuando las proteínas son inyectadas por debajo de la monocapa de DPPC previamente formada a  $\Pi \sim 3$  mN/m y con un tiempo necesario para favorecer la adsorción, se presenta un punto de inflexión en las curvas de presión lateral *versus* tiempo, que corresponde a una transición de fase observada con MAB. El tiempo para alcanzar una estabilización asintótica o meseta es aproximadamente 5-10 minutos para la apo CI ( $\Pi \sim 22$  mN/m;  $\sim 4.541 \times 10^{15}$  moléculas), y para la apo AII, aproximadamente un tiempo de 8-10 horas ( $\Pi \sim 18$  mN/m;

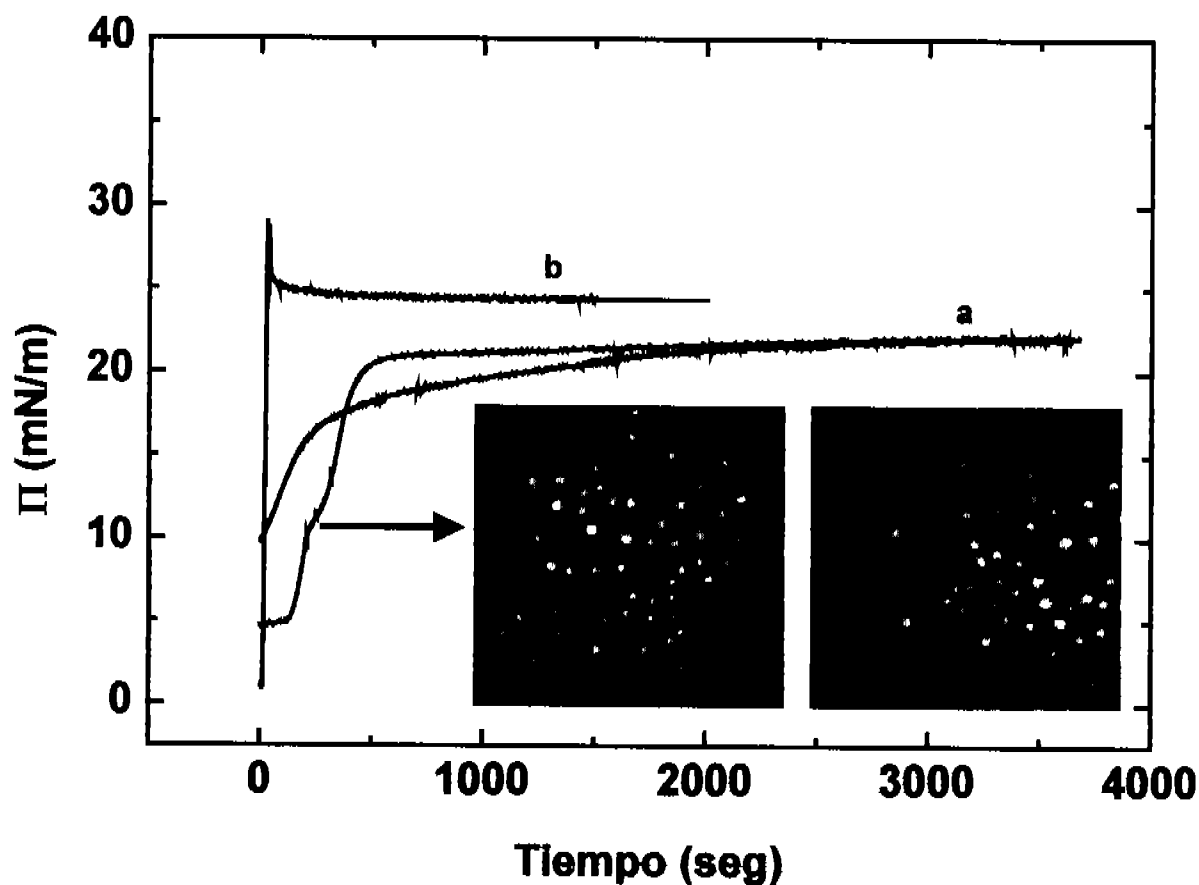


$\sim 1.729 \times 10^{15}$  moléculas). Probablemente existen dos procesos que controlan la adsorción/penetración de las apolipoproteínas dentro de la monocapa de DPPC: 1) una relacionada al transporte de la proteína a la monocapa (difusión), 2) otra relacionada a la incorporación de la proteína en la interfase aire/agua. También se ha sugerido que las diferencias de tiempo para alcanzar el estado estacionario (meseta) en ambas proteínas pueden atribuirse, a que la apo All se encuentra como dímero y la apo CI como monómero. Es decir que la apo All en forma dimérica es de mayor tamaño y por consiguiente su coeficiente de difusión debe de ser más pequeño. Durante los procesos de incorporación de proteína hacia la interfase, las interacciones hidrofóbicas juegan un papel importante en la velocidad de difusión de la proteína y en los reconocimientos con los fosfolípidos en la interfase aire/agua. Los valores de momento hidrofóbico al parecer guardan una relación directa en los procesos de incorporación de proteína en la monocapa de DPPC; la apo All muestra un valor de  $0.415 \text{ kcal/molécula}^{-1}\text{residuo}^{-1}$ , mientras que la apo CI es de  $0.45 \text{ kcal/molécula}^{-1}\text{residuo}^{-1}$ . Otra contribución importante puede ser de origen electroestático entre la monocapa de DPPC y las proteínas. La monocapa de DPPC en el pH que se trabaja no presenta carga, pero posiblemente, el momento dipolar permite que pueda interaccionar con las proteínas mostrando una carga positiva la apo CI y una carga negativa para la apo All.

En las figuras 34 y 35 se muestran los fenómenos de adsorción de DPPC cuando las apolipoproteínas son dispersadas por debajo de la monocapa a una presión lateral de  $\Pi \sim 20 \text{ mN/m}$ . En el tiempo de transición de ambas proteínas, primeramente hay una pérdida en la presión lateral y un incremento en forma gradual hasta alcanzar el equilibrio después de varias horas. Sin embargo el límite de la presión lateral no fue el esperado, debido a que la mayoría de las partículas proteicas no penetraron a la monocapa de DPPC, generando un verdadero problema para observar la siguiente transición de fase. La cantidad de proteína utilizada para estos experimentos fue la necesaria para alcanzar y superar la transición de fase *L/LC*. Isotermas de DPPC/apolipoproteínas muestran una segunda transición de fase entre fases condensadas a una presión lateral para la apo CI de ca.  $24 \text{ mN/m}$  y para la apo All de ca.  $28 \text{ mN/m}$ . Durante el proceso de adsorción en ambas monocapas, la presión lateral únicamente alcanza el principio de la transición de fase *L/LC*, pero nunca supera a la presión de la transición. Se observó con MAB que conforme la apo CI se integra en la interfase para interaccionar con el DPPC, la monocapa comienza a presentar una

textura de menor contraste después de un tiempo de espera. En algunos casos como en la apo AII, fue posible observar algunos dominios con diferentes matices de grises que corresponden al comienzo de la transición de fase *L/LC* (inserto de la figura 35).

En las figuras 32 y 33 se muestran dos ejemplos de adsorción de las apolipoproteínas CI y AII en monocapas de DPPC, utilizando el método de disolución y dispersión. Con este método se observa como la monocapa de DPPC/proteína se forma en unos cuantos segundos con una meseta que alcanza prácticamente la misma presión lateral, en comparación con las que se obtuvieron utilizando el método por inyección. La dispersión de DPPC en cloroformo conduce a un movimiento violento en la subfase y favorece que el transporte de la proteína hacia la interfase sea más rápido para interactuar con el fosfolípido e incrementa la presión lateral instantáneamente; sugiriendo que las moléculas proteicas se encuentran orientadas sobre la interfase aire/agua. Como se mencionó en la sección experimental, es importante recordar que las monocapas preparadas con este método y después de la relajación producen los mismos resultados en comparación con el método de inyección. Sin embargo utilizando el método de disolución y dispersión, el tiempo requerido es particularmente reducido para la preparación de películas de DPPC/proteína.



**Figura 32.** Penetración de la apo CI dentro de la monocapa de DPPC a una  $\Pi \sim 3 \text{ mN/m}$ , mediante el método de inyección (a) y el método de dispersión-disolución (b). Los insertos muestran imágenes de MAB de la monocapa de DPPC penetrada por la apo CI a la presión indicada.

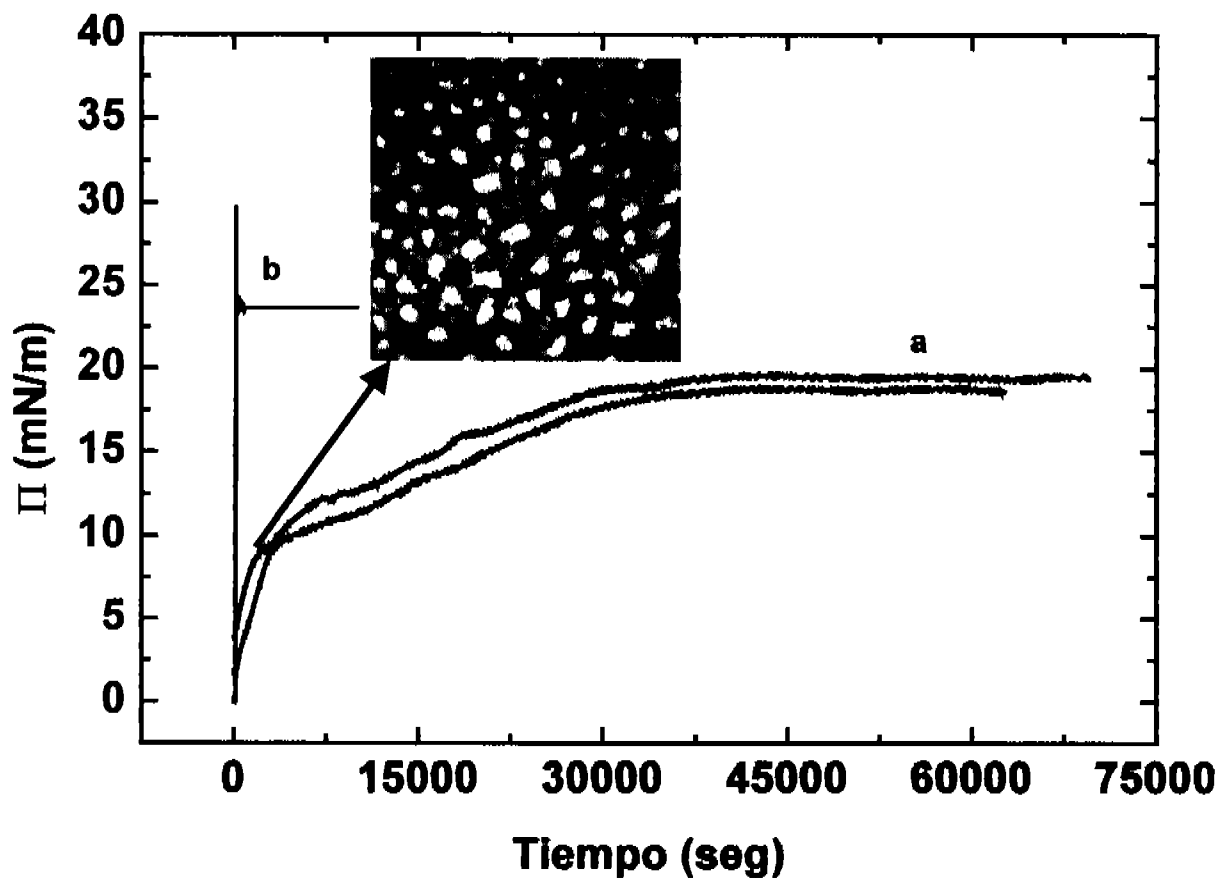
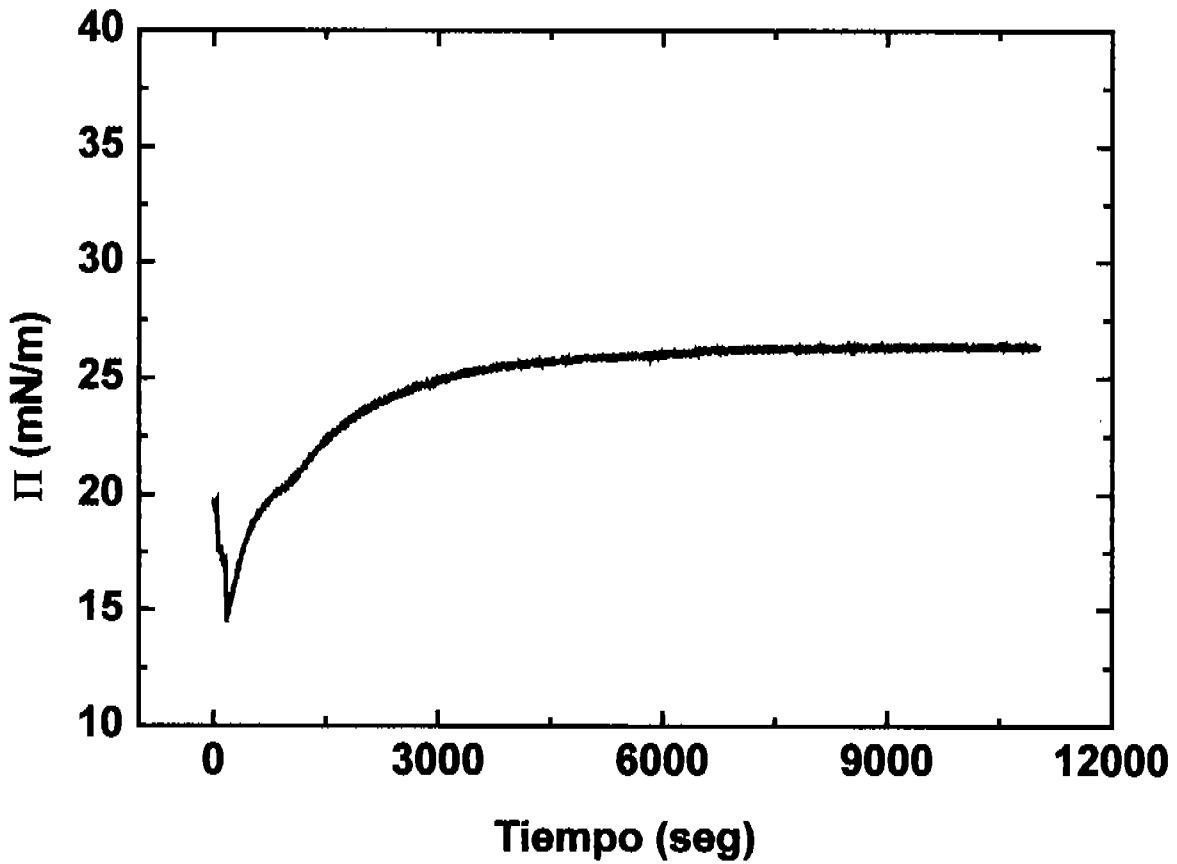
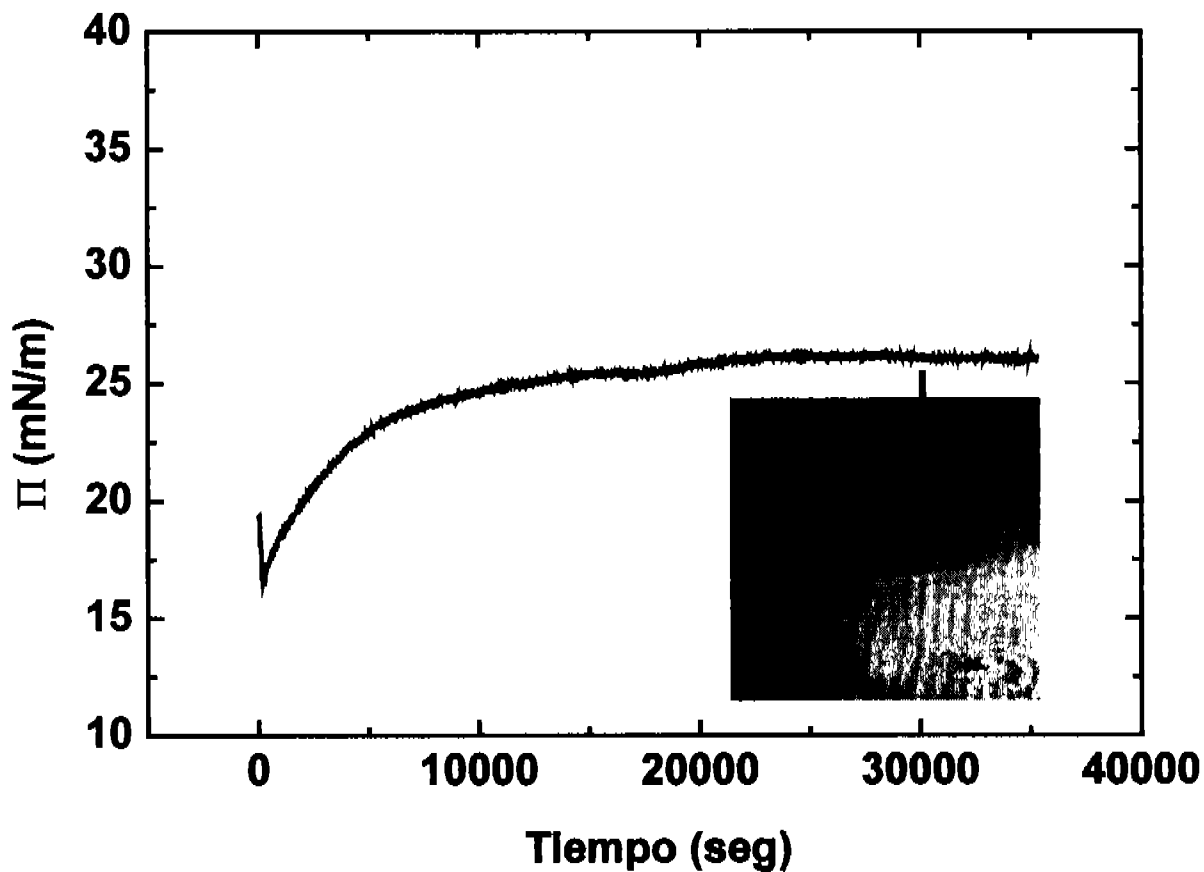


Figura 33. Penetración de la apo All dentro de la monocapa de DPPC a una  $\Pi \sim 3 \text{ mN/m}$ , mediante el método de inyección (a) y el método de dispersión y disolución (b). El inserto muestra una imagen de MAB de la monocapa de DPPC penetrada por la apo All a la presión lateral indicada.



**Figura 34.** Evolución de la presión lateral en función del tiempo en la apo CI. La penetración de proteína se realizó a  $\Pi \sim 20$  mN/m mediante el método de inyección.



**Figura 35.** Evolución de la presión lateral en función del tiempo de la apo All. La penetración de proteína se realizó a  $\Pi \sim 20$  mN/m, mediante el método de inyección. El inserto muestra una imagen de MAB de la monocapa de DPPC penetrada por la apo All a la presión lateral indicada.

### **Área que ocupan las apolipoproteínas CI y AII en la Interfase lípido/agua**

Se realizaron experimentos de adsorción y penetración para determinar el área que pudieran ocupar las moléculas de apolipoproteínas inyectadas por debajo de la monocapa de DPPC, evaluando si todas las moléculas penetran completamente a dicha monocapa o si existen proteínas libres en la subfase.

Mediante el método de inyección se estimó la cantidad de proteína en la monocapa de DPPC colocada en la interfase aire/agua, previamente se formó una monocapa de DPPC a una área de  $290 \text{ cm}^2$  manteniendo la presión lateral a  $\Pi \sim 3.0 \text{ mN/m}$  y con las barreras de la palangana libres para moverse una vez que las moléculas proteicas penetran a la monocapa. Se dispersó una cantidad de proteína conocida por debajo de la monocapa de DPPC y después de un tiempo apropiado se alcanzó una área máxima dependiendo de la proteína (Figura 36). El incremento de área debido a la penetración de proteína fue comparado con el área que ocupan las apolipoproteínas depositadas en una solución de fosfatos conteniendo  $3.5 \text{ M}$  de KCl. Se observó que alrededor del  $\sim 14\text{-}15 \%$  de las moléculas proteicas no difunden a la interfase, por lo tanto no se incorporan con la monocapa de DPPC. Como las monocapas binarias son sistemas diluidos (fracción mol nominal,  $X_{DPPC} = 0.88\text{-}0.99$ ), se ha considerado que el área molar parcial de cada componente en la mezcla es igual al área molar de los compuestos puros. La conformación cilíndrica que adquieren las apolipoproteínas cuando son depositadas en una subfase altamente iónica, es semejante a las estructuras y dimensiones de las apolipoproteínas estudiadas a baja fuerza iónica en otros sistemas biológicos. Las áreas moleculares que guardan las apolipoproteínas obtenidas partir de isothermas en superficies de agua sin cubrir con DPPC, pudiera ser incorrecta, debido a que las apolipoproteínas no forman monocapas de Langmuir y en ciertas presiones específicas el área de la monocapa revela justo el equilibrio entre las proteínas en la monocapa y la subfase. Las diferencias mínimas en el tamaño, se debe posiblemente a la baja sensibilidad que existe para obtener información, acerca de un sistema que trabaja con una subfase iónica. Finalmente, este problema se puede resolver mediante análisis de difracción de rayos X en monocapas binarias DPPC/apolipoproteínas, así mismo, estas mezclas binarias pueden ser transferidas para hacer películas de Langmuir-Boldgett para ser analizadas con MFA. Se ha estimado que alrededor del  $15 \%$  de la proteína no penetra a la monocapa de

DPPC en una presión lateral de 3 *mN/m*, probablemente, porque las apolipoproteínas están disueltas dentro de la subfase o están adsorbidas en las barreras de Teflón de la palangana. La figura 36 muestra ejemplos de evolución de área como una función del tiempo para la apo CI y apo AII. Después de 2 horas la apo CI alcanza una área máxima promedio de 401.3 cm<sup>2</sup> y de 396.1 cm<sup>2</sup> para el caso de la apo AII. Las diferencias de área promedio debido a la penetración de proteína, son de 113.9 cm<sup>2</sup> para la apo CI y de 106.0 cm<sup>2</sup> para la apo AII.

El incremento de área debido a la penetración de las apolipoproteínas, puede ser modelado utilizando expresiones matemáticas que a continuación se describen. El área total de la monocapa (DPPC+proteína) es  $A' + A^p$ , donde  $A'$  es el área previamente cubierta por el DPPC (la cual es una constante) y  $A^p$  es el incremento de área debido a la penetración de la proteína; i.e.,  $A^p = a_s N_{mono}$ , donde  $a_s$  es el área por proteína y  $N_{mono}$  es el número de moléculas de proteína que penetran a la monocapa (área  $A$ ). Para poder extrapolar los datos experimentales a este sistema matemático, se necesitan dos suposiciones. La primera es que  $a_s$  es una constante a lo largo de todo el proceso de penetración, siempre y cuando la presión lateral se mantenga constante ( $\Pi=3.0$  *mN/m*). Como las apolipoproteínas se comportan geoméricamente como cilindros rígidos, cada proteína va hacia la superficie incrementando el área específica  $a_s$ .

La segunda suposición es que la velocidad de incremento de área,  $\frac{dA}{dt}$ , debido a la penetración de proteína es proporcional a la concentración de proteína en la subfase, i.e.,

$$\frac{dA^p}{dt} = k[P_{sub}] \quad (13)$$

$[P_{sub}] = N_{sub}/V_{sub}$  es la concentración de la proteína en la subfase,  $N_{sub}$  es el número de proteínas en la subfase y  $V_{sub}$  es el volumen en la subfase. El número total de proteínas en el sistema  $N_T$ , es la suma de las proteínas en la subfase más  $N_T = N_{sub} + N_{mono}$  en la monocapa. Entonces, el cambio total de área en la palangana por unidad de tiempo es:

$$\frac{d}{dt}(A' + A^p) = \frac{dA}{dt} = k[P_{sub}] = \frac{d}{dt}(a_s N_{mono}) = \frac{k(N_T - N_{mono})}{V_{sub}} \quad (14)$$



de aquí, se obtiene una ecuación diferencial de primer orden:

$$\frac{dN_{mono}}{dt} + \frac{k}{a_s V_{sub}} N_{mono} = \frac{k}{a_s V_{sub}} N_T \quad (15)$$

resolviendo esta ecuación y multiplicando por  $a_s$ , se obtiene la ecuación 16.

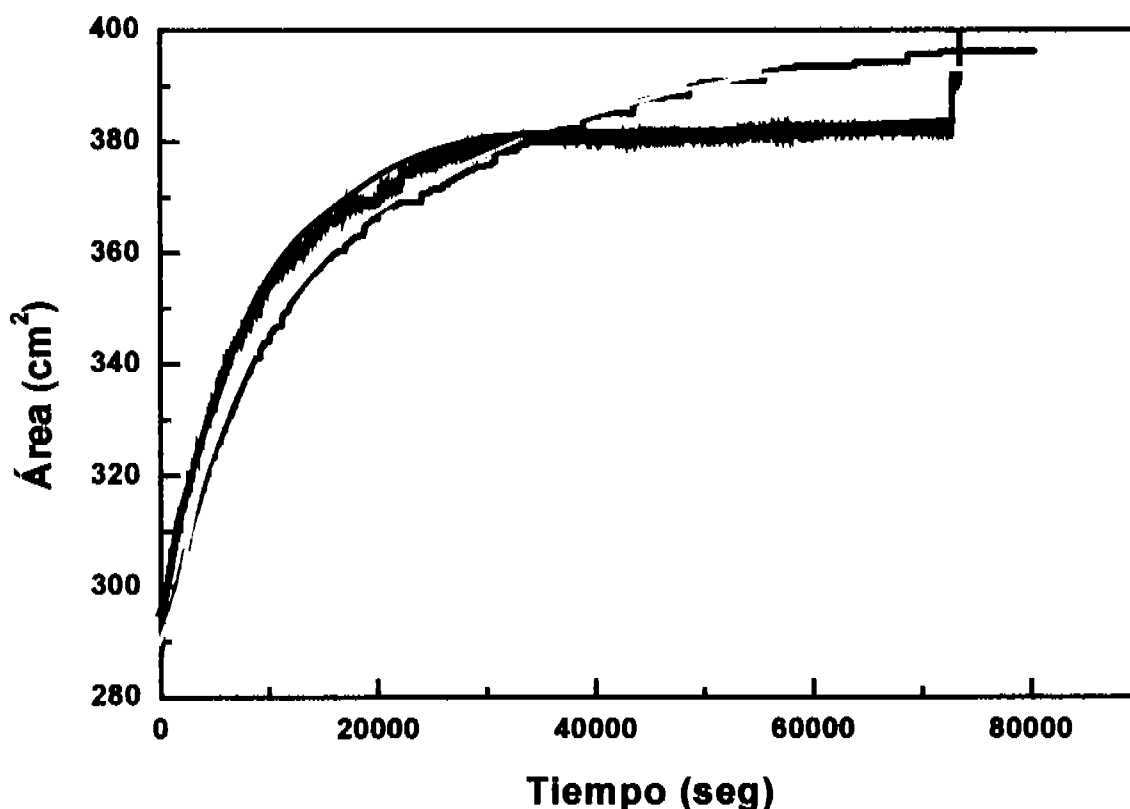
$$A^p(t) = a_s N_T + a_s (N_o - N_T) \exp\left\{-\left[k/(a_s V_{sub})\right]t\right\} \quad (16)$$

aquí,  $N_o$  es el número de moléculas de proteínas en la monocapa en  $t=0$ .

La ecuación 16 ha sido utilizada para ajustar las curvas de las áreas de las monocapas penetradas *versus* tiempo (Figura 36). En las curvas de esta figura se pueden observar como las áreas teóricas presentan una buena aproximación con los valores de las áreas experimentales. Las curvas ajustadas de manera teórica muestran los siguientes valores de  $k$ :  $6.12 \times 10^{25} \text{ A}^5 \text{ s}^{-1} \text{ molécula}^{-1}$  para la apo CI y  $13.6 \times 10^{25} \text{ A}^5 \text{ s}^{-1} \text{ molécula}^{-1}$  para la apo All. Los valores de  $K$  indican que la apo All penetra a la monocapa de DPPC con mayor facilidad que la apo CI. Sin embargo, considerando el valor de momento hidrofóbico y la velocidad de difusión hacia la subfase, se ha sugerido que la apo CI es más eficiente para organizarse con la monocapa de DPPC en la interfase. La capacidad que muestran los valores constantes de  $k$  para incorporación de proteína en la interfase y la interacción proteína/interfase a partir de los valores obtenidos para  $k$ , muestran que estas propiedades no estiman apropiadamente la capacidad de incorporación de la proteína en monocapas de DPPC.

Desde otro punto de vista, para fundamentar que la apo All interacciona con mayor fuerza con la monocapa DPPC con respecto a la apo CI, es empleando datos experimentales que muestra la adsorción de proteína en diferentes interfaces, procurando que el área de dispersión sea constante. Se ha observado que a bajas presiones laterales, la adsorción de la apo All en la interfase es muy eficiente cuando está cubierta con DPPC, debido a que el sistema necesita un tiempo suficiente de equilibrio. Sin embargo, la adsorción de la apo CI a bajas presiones laterales (antes de

la transición de fase *L/LC*), es idéntica entre la interfase aire/agua y la interfase cubierta con la monocapa de DPPC. En ambos casos, por arriba de la transición de fase *L/LC* es necesario mantener cubierta a la subfase con DPPC, con la finalidad de mantener a la proteína en la interfase aire/agua que está interaccionado con el fosfolípido. Por otro lado, cuando se usa una subfase con una fuerza iónica todas las proteínas son expulsadas de la subfase para integrarse a la interfase aire/agua (para este caso *II* es más grande) como un efecto "salting-out", favoreciendo la formación de una monocapa de Langmuir (Bolaños y col., 1999; Ruiz-García y col., 2003).



**Figura 36.** Ejemplos de evolución de área como una función del tiempo a presión constante ( $\Pi \sim 3.0 \text{ mN/m}$ ), a  $25^\circ\text{C}$ . La línea de color azul muestra la curva de la apo CI y la línea de color negro muestra la curva de la apo AII. Sobre cada línea se observan las curvas ajustadas: color rojo (apo CI) y color amarillo (apo AII).

### **Transiciones de fase de las monocapas binarias lípido/proteína**

Después de adsorber y penetrar a la monocapa de DPPC con las apolipoproteínas CI y AII, estos sistemas binarios se expanden hasta desvanecer completamente la presión lateral y después de un tiempo de equilibrio fueron comprimidas para obtener una isoterma típica de  $\Pi$  vs  $a$ . Las figuras 37 y 38 muestran las isotermas en 25 °C para los sistemas binarios de DPPC/apo CI y DPPC/apo AII, utilizando diferentes cantidades de proteína. Los resultados obtenidos muestran semejanza con sistemas tridimensionales, donde se observan dominios y transiciones de fase con poca definición. Las transiciones de fase en sistemas binarios se presentan en un intervalo grande de presión lateral, sin determinar con precisión donde termina y comienza la fase. Sin embargo, durante la compresión lateral de las monocapas binarias de lípido/proteína, se observan las tres transiciones de fase a lo largo de las isotermas. A bajas presiones laterales se presentan una primera transición de fase de primer orden de poco interés para nuestros estudios, entre una gas y una fase líquida binaria de poco contraste. Esta transición de fase se presenta a una presión lateral de  $\Pi \sim 0$  mN/m, donde la isoterma muestra una pendiente horizontal, la cual termina en una área de  $\sim 140-160 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$  dependiendo de la cantidad de proteína agregada.

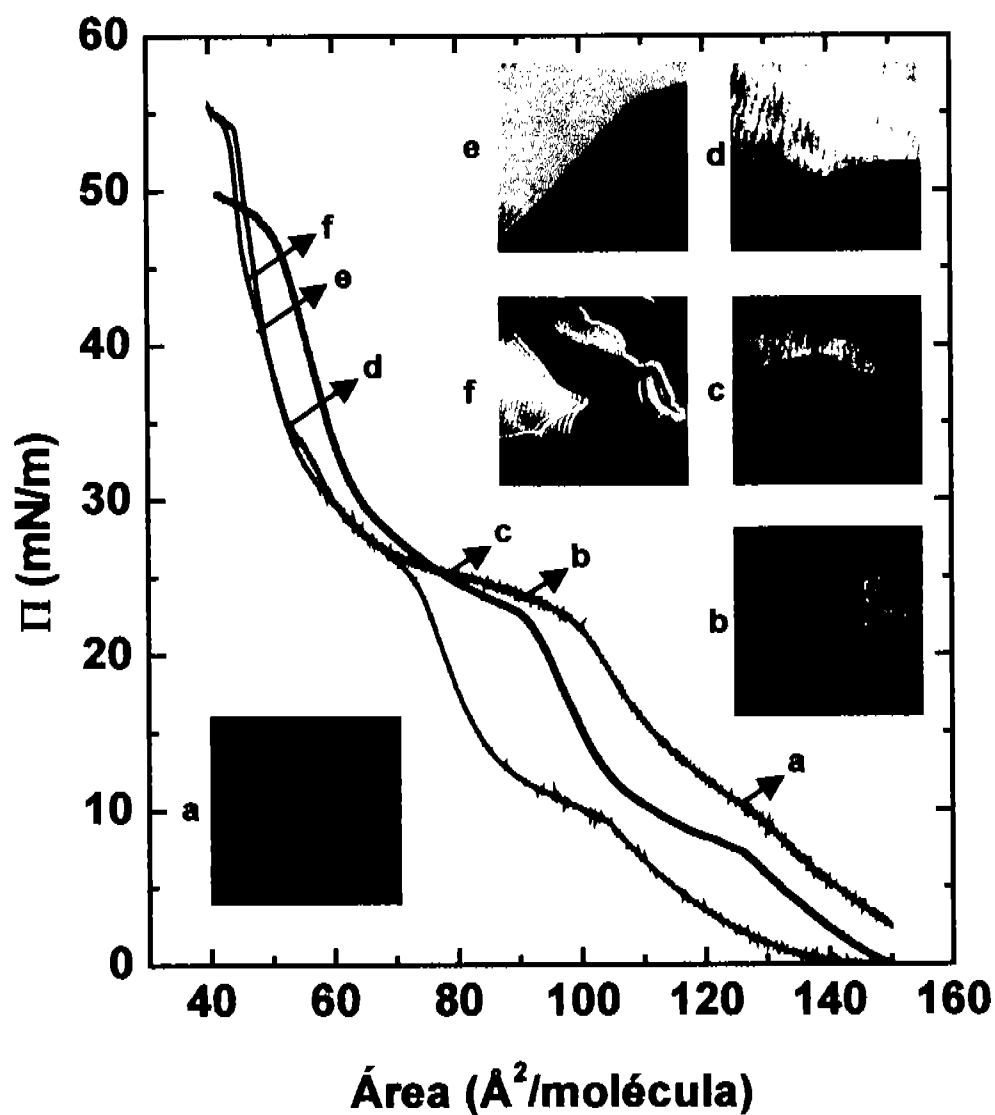
Con un incremento en la presión lateral se presenta la siguiente transición de fase, que corresponde a una transición entre fases condensadas L/LC. Durante esta transición de fase se observan dominios que revelan el comienzo de una nueva de fase a una presión de  $\Pi \sim 8-11$  mN/m y  $a \sim 100-125 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ , la cual depende de la cantidad de proteína utilizada en el sistema. En este intervalo de presión se muestran imágenes de MAB que revelan el principio de la transición de fase observándose dominios sólidos que comienzan a ser nucleados a partir de la fase L. Estos dominios sólidos son pequeños con textura granulosa y parecidos a los dominios que se encuentran en la transición de fase de DPPC a  $\Pi \sim 9-12$  mN/m. Con un mayor incremento en la presión lateral los pequeños dominios sólidos se unen para formar una película extensa presentando una superficie de textura rugosa o granulosa. Durante esta transición de fase también se observa un segundo tipo de dominios que comienzan a ser nucleados a partir de la fase L y se componen básicamente de dominios de poco contraste. Estos dominios presentan texturas homogéneas que forman superficies lisas sin contraste y a estas presiones laterales no son muy abundantes en toda el área de la

monocapa. Cuando se presenta el comienzo de esta transición de fase, la fase *L* metastable es fluida y rápidamente se desvanece con un pequeño incremento en la presión. Los dominios lisos con textura homogénea presentan un color gris de gran intensidad, similares a la fase *L* y con una textura más oscura que los dominios rugosos con un color gris claro. Sin embargo, cuando la presión lateral incrementa, los dos tipos de dominios pueden ser observados claramente con MAB. Ambos tipos de dominios se asemejan a las texturas de las fases  $\alpha/\beta$  en mezclas binarias tridimensionales, donde microestructuras dependen de la dirección específica para obtener las dos fases. En las figuras 37 y 38 se muestran los ejemplos de las isothermas mostrando las diferentes transiciones de fase y las imágenes de MAB observadas en ambas proteínas.

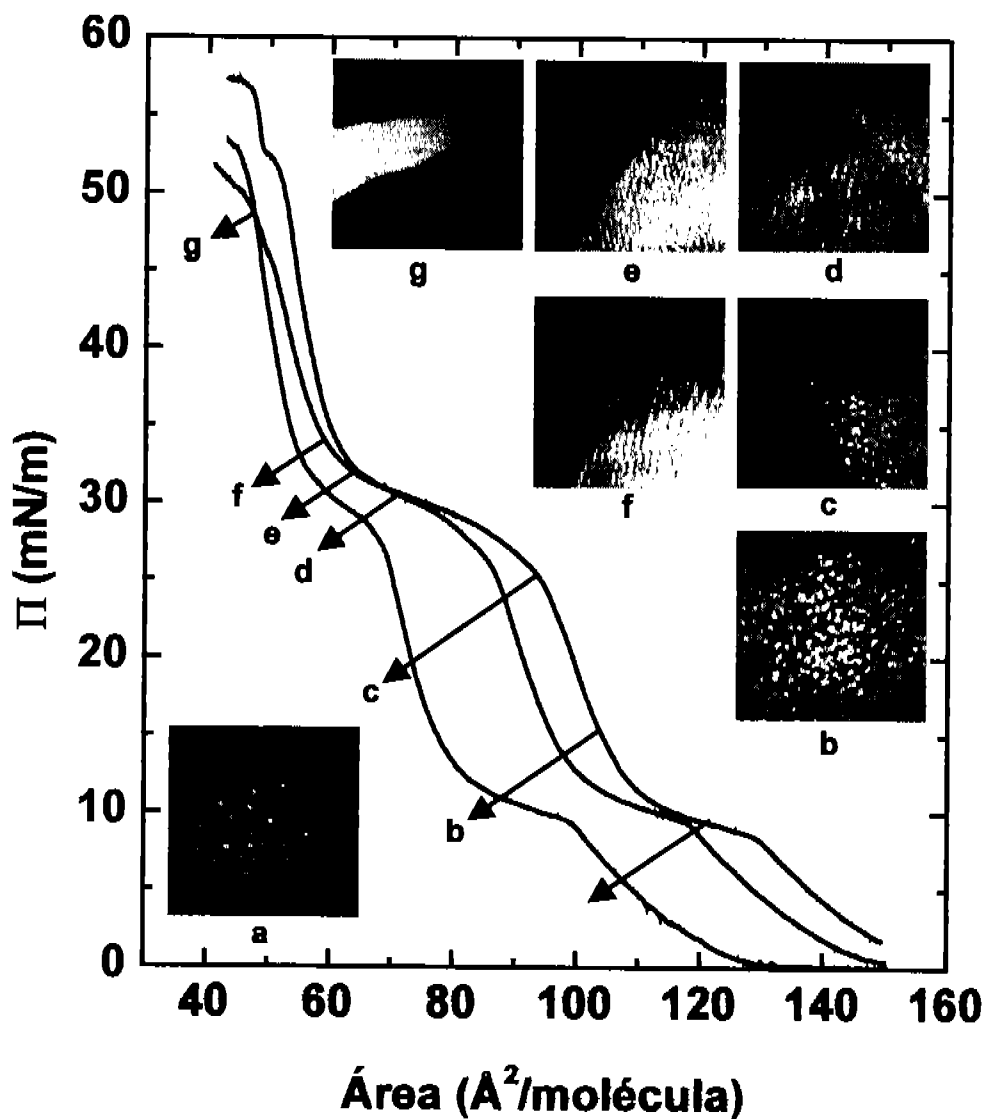
Con un incremento mayor en la presión lateral se presenta una nueva transición de fase que aparece para modificar a una de las fases anteriores. Esta transición de fase comienza con un hombro pronunciado o punto de inflexión a una presión lateral de  $\Pi \sim 24\text{-}27 \text{ mN/m}$  y un área de  $a = 65\text{-}100 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$  para el DPPC/apo CI, y  $\Pi \sim 28\text{-}31 \text{ mN/m}$  y  $a = 60\text{-}90 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$  para el DPPC/apo AII (Figuras 37 y 38). Durante esta transición de fase se observa una pérdida considerable de área por partícula, semejante a la que se había observado en las isothermas de las apolipoproteínas puras a una misma presión lateral. Las imágenes de MAB muestran, que durante el comienzo de esta transición de fase se observan cambios de reflexión debido a que los dominios de menor contraste de color gris tenue, comienzan a convertirse a dominios altamente brillantes conforme incrementa la presión lateral. Los dominios que conforman la fase rugosa al parecer mantienen la misma organización y textura que la fase anterior, pero debido al aumento de contraste no lineal que presenta el microscopio, estos dominios adquieren una textura de color gris más oscuro. Las transiciones de fase que se presentan a lo largo de las isothermas, son reproducibles durante los procesos de compresión y expansión de la monocapa binaria lípido/proteína (Figuras 39 y 40).

Durante la compresión lateral de las monocapas binarias por arriba de las transiciones de fase, descritas anteriormente, se observan cambios de contraste en las imágenes de MAB ( $\Pi \sim 49 \text{ mN/m}$  para el DPPC/apo CI y  $47.5\text{-}49 \text{ mN/m}$  para el DPPC/apo AII). La organización molecular que presentan estos cambios de contraste no son evidentes en las isothermas, posiblemente se debe a que dichos arreglos no alteran de manera significativa la tensión superficial en la interfase. Durante esta

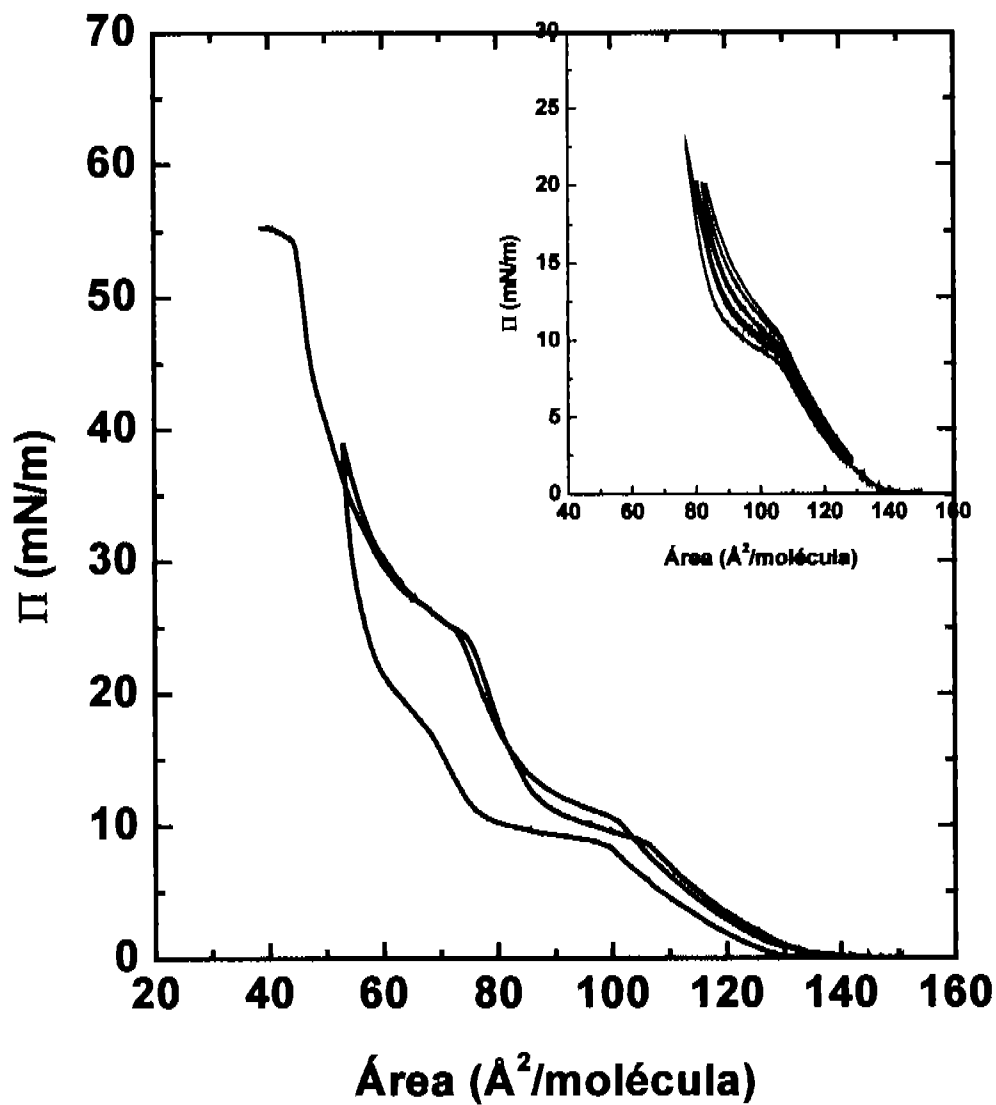
presión lateral, los dominios brillantes comienzan a fundirse en dominios de color gris oscuro lo largo de toda el área de la monocapa, hasta obtener una monocapa homogénea de un solo contraste (Figura 41). Las imágenes de MAB de las monocapas binarias muestran dominios homogéneos con texturas de color gris claro, similares a los dominios que se habían observado en monocapas de DPPC a esta presión lateral. Consideramos que a esta presión lateral se presenta otra transición de fase, muy difícil de describirla debido al colapso cercano y porque la isoterma no muestra un punto de inflexión.



**Figura 37.** Isothermas típicas de  $\Pi$  vs  $a$  de las monocapas binarias de DPPC/apo CI, a  $25^\circ\text{C}$ . Las curvas están representadas de izquierda a derecha mostrando las siguientes fracciones mol  $X = 0.04$ ,  $0.05$  y  $0.12$  respectivamente. Los insertos muestran imágenes de MAB a diferentes presiones laterales.

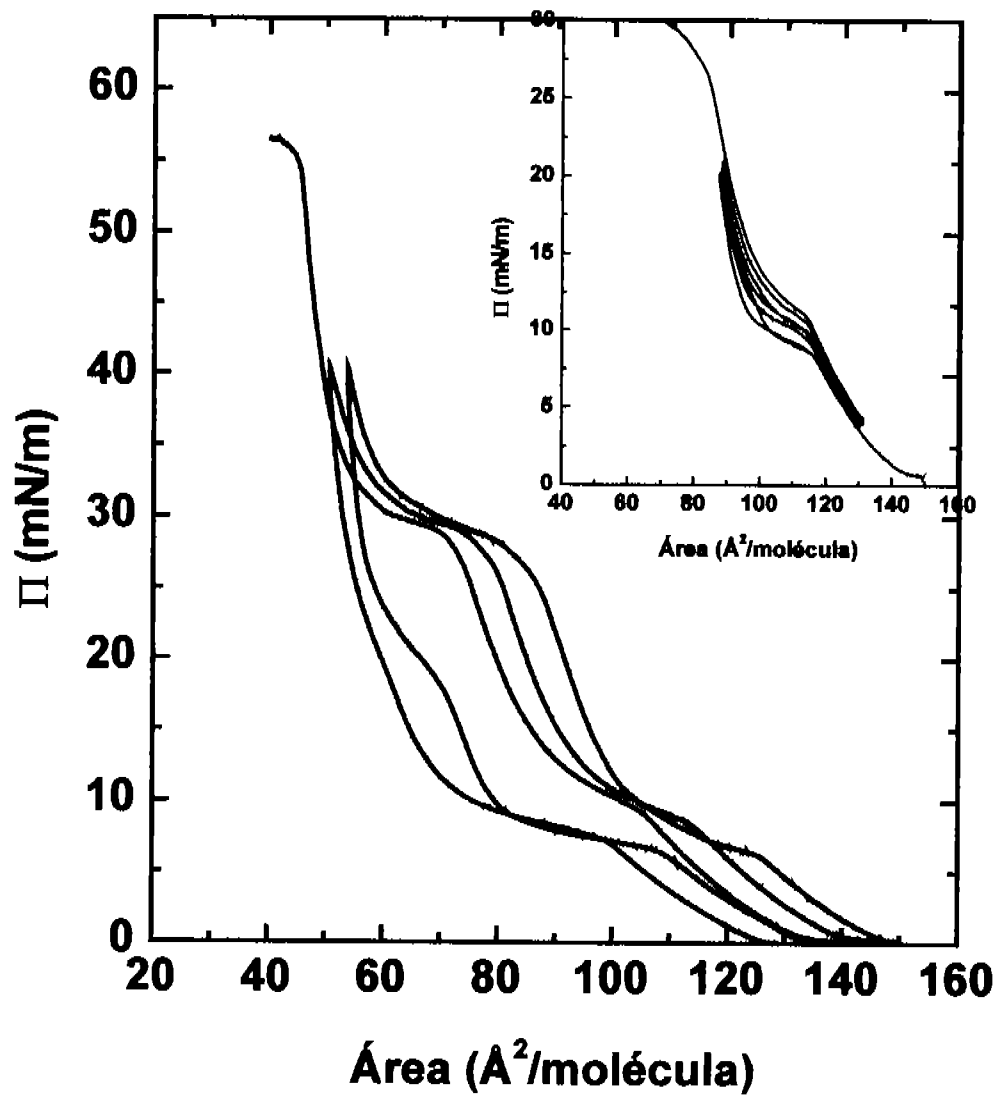


**Figura 38.** Isotermas típicas de  $\Pi$  vs  $a$  de las monocapas binarias de DPPC/apo AII, a 25°C. Las curvas están representadas de izquierda a derecha mostrando las siguientes fracciones mol  $X = 0.01$ ,  $0.02$  y  $0.03$  respectivamente. Los insertos muestran imágenes de MAB a diferentes presiones laterales.



**Figura 39.** Ciclos de compresión y expansión de la isoterma típica  $\Pi$  vs  $a$  de DPPC conteniendo a la apo CI.





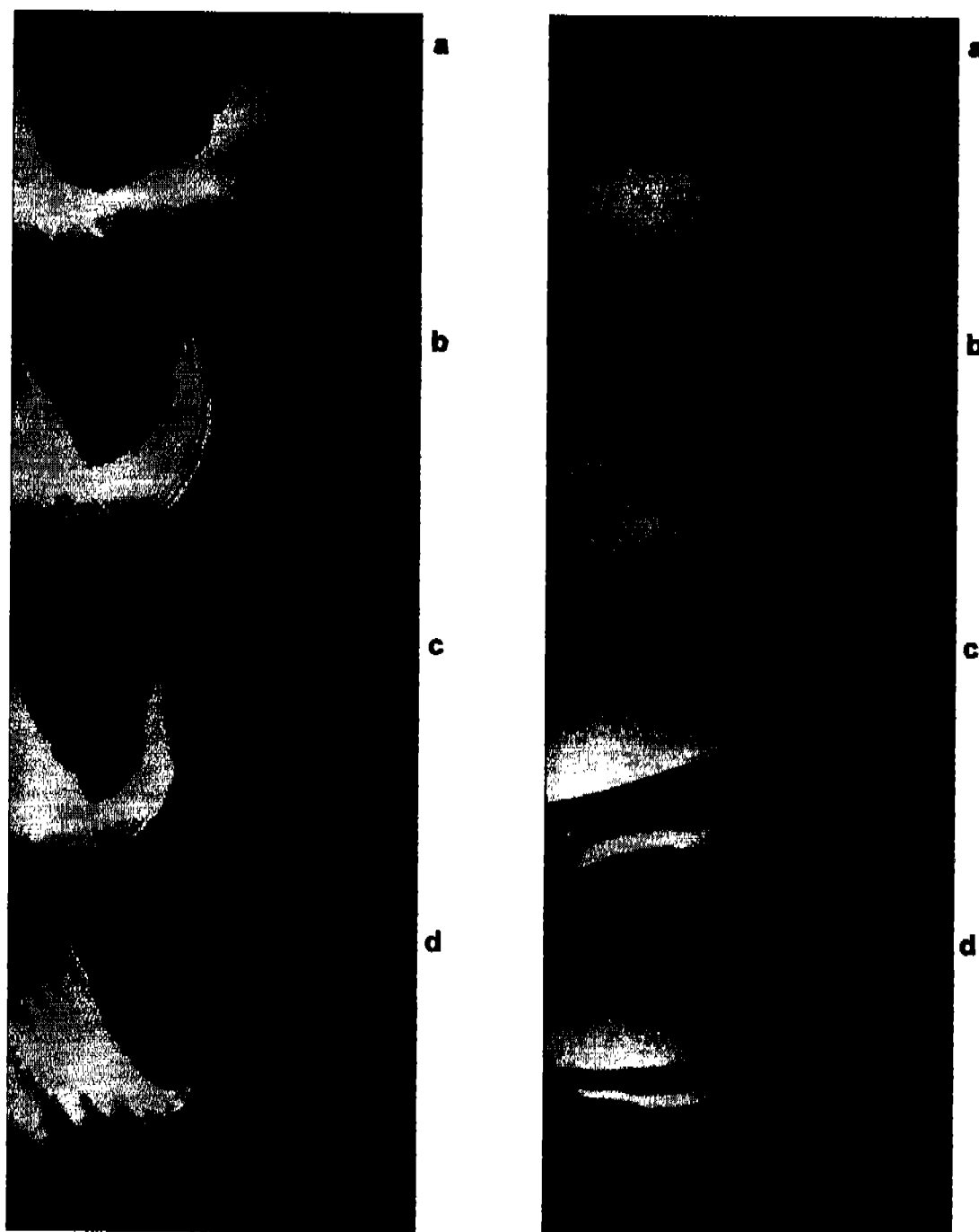
**Figura 40.** Ciclos de compresión y expansión de la isoterma típica  $\Pi$  vs  $a$  de DPPC conteniendo a la apo AII.

Para obtener una mejor interpretación de las diferentes transiciones de fase durante la compresión lateral de la monocapa, fue necesario considerar a las moléculas de DPPC como anfifilos, con una cabeza hidrofílica y dos cadenas hidrocarbonadas. De acuerdo a los cálculos teóricos, la apo C1 presenta dos hélice  $\alpha$  anfipáticas de aproximadamente 28.5 y 40.5 Å en longitud unidas por región no estructurada, mientras que la apo AII presenta dos cadenas polipeptídicas unidas por un puente disulfuro en la posición 6, donde cada cadena presenta dos hélice  $\alpha$  anfipáticas de 31.5 y 54 Å en longitud unidas por una región no estructurada. A bajas presiones laterales la región hidrofílica de las hélice  $\alpha$  junto con las cabezas polares de DPPC se encuentran en contacto con la subfase del agua, mientras que la región hidrofóbica de las hélice  $\alpha$  y las colas de DPPC están orientadas hacia el aire. El área cubierta por la monocapa de lípido/proteína a una baja presión lateral, es la suma de las áreas cubiertas por las moléculas de proteína y DPPC. Sin embargo, a lo largo de la transición de fase a una presión lateral de  $\Pi \sim 10$  mN/m se forman dominios de las dos fases, los dominios ricos en proteína y los dominios ricos en DPPC. Uno de los dominios se forman por la coalescencia de dominios pequeños, similares a las observadas en monocapas de DPPC y probablemente sean los dominios ricos de fosfolípidos. Las imágenes de MAB muestran a texturas rugosas que se asemejan a las imágenes observadas en DPPC puro, mostrando a una superficie de un mismo patrón de rugosidad. Los dominios de la segunda fase son menos abundantes que los dominios rugosos, presentan una superficie con una textura lisa sin contraste y de los cuales forman una fase que es rica en proteína. Las moléculas de DPPC presentes en los dominios rugosos están inclinadas y ordenadas orientacionalmente, mientras que las hélice  $\alpha$  de los dominios lisos están dispuestas sobre la superficie del agua. Durante la transición de fase a una  $\Pi \sim 24-31$  mN/m se presenta un cambio de área por partícula en la isoterma. En esta transición de fase, los dominios de la fase rugosa mantienen su reflectividad constante, sugiriendo que la inclinación de las cadenas hidrocarbonadas de DPPC no cambian de dirección. Sin embargo, los dominios de la fase lisa rica en proteína cambian de contraste a una fase más brillante, semejante a la transición de fase *L/LC* que se ha observado en monocapas de apolipoproteínas.

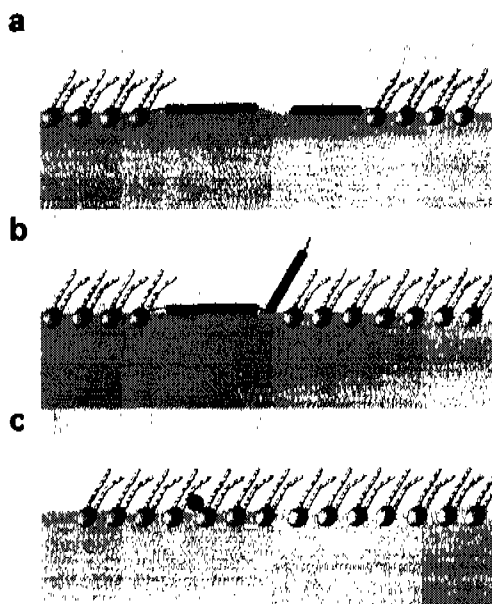
Es posible que las moléculas de proteínas en monocapas de DPPC sufren cambios de conformación a la misma presión lateral como en monocapas de apolipoproteínas en una subfase iónica. Tomando en cuenta que la fórmula de reflectividad de MAB es una función cuadrática en películas delgadas y considerando que una de las regiones hélice  $\alpha$  de las monocapas de apolipoproteínas puras, se desprenden de la interfase aire/agua. Se ha considerado que las proteínas incorporadas en la monocapa de DPPC, uno de sus segmentos hélice  $\alpha$  de la apo CI o dos segmentos de hélice  $\alpha$  de la apo AII se desprenden de la subfase para alinearse de acuerdo a la orientación que adquieren las colas hidrocarbonadas del fosfolípido. Los cambios de conformación que se observan en estas proteínas, corresponden a pérdidas de área, relacionados con los desprendimientos de regiones hélice  $\alpha$  de la subfase de agua. Sin embargo, el punto más difícil de explicar, son los eventos que ocurren después de la transición de fase *L/LC* y cuando los dominios de la fase brillante se desvanecen a dominios sin contraste de color gris. Durante esta presión hay una pérdida de grosor y de contraste en la monocapa, con una reflectividad que se asemeja a la textura que guarda la monocapa de DPPC puro o de los dominios ricos en DPPC de la monocapa binaria (Figuras 42 y 43). La pérdida de grosor y el bajo contraste se debe a que la monocapa de DPPC expulsa a la proteína de la interfase aire/agua. El área por partícula en el colapso para las monocapas binarias en ambas proteínas, es muy cercano al área por partícula para el colapso de la monocapa de DPPC (Figura 31). En las figuras 42 y 43 se muestran dos ejemplos de cómo la proteína se organiza cuando es expulsada de la interfase. Cuando las moléculas de apo CI son expulsadas de la interfase aire/agua presentan la capacidad de organizarse como en la fase *L*, saliendo de la interfase para orientarse sobre las cabezas y entre las colas de DPPC (Figura 42). Consideramos que el espacio requerido para colocar a una molécula de proteína entre la monocapa de DPPC, es justamente el diámetro de una hélice  $\alpha$  de 5 Å. De acuerdo con el tamaño que muestran las cabezas de DPPC, probablemente presenten un pequeño defecto, durante la inclinación de la fase ordenada. Las moléculas de DPPC que rodean justamente a las hélice  $\alpha$  de la apo CI incorporadas en la región no polar del fosfolípido, posiblemente estén desordenadas. El orden que guardan las cabezas del fosfolípido no es muy claro, pero entre los arreglos hay espacios que pueden ser ocupados por una hélice  $\alpha$  sin una modificación importante de

la monocapa. De esta manera, las regiones hidrofóbicas de las proteínas interaccionan con las cabezas y las regiones hidrofílicas con las colas de DPPC.

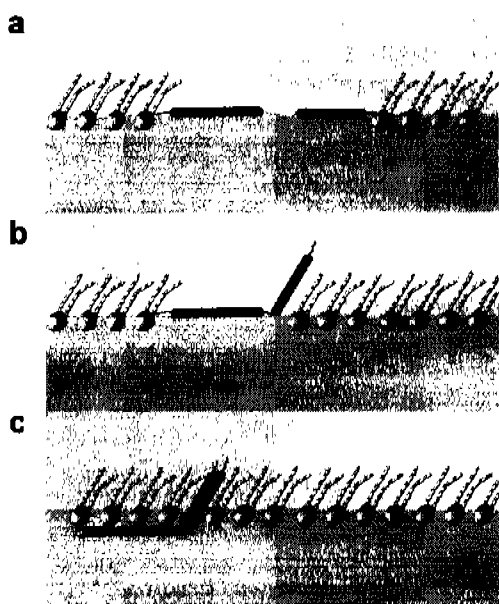
Para el caso de la apo AII es aún más difícil poder explicar como se organizan sus dos cadenas polipeptídicas, cuando son aparentemente expulsadas de la interfase lípido/proteína. De acuerdo con la propuesta que se tiene de la forma de cómo es expulsada la apo CI de la monocapa de DPPC, sería muy difícil aplicar este modelo para el caso de la apo AII debido a que es una molécula con dos cadenas polipeptídicas ocasionando una distorsión considerable en la organización de la monocapa del fosfolípido. Se ha propuesto que dos hélice  $\alpha$  se encuentran inclinadas con la misma dirección de las colas del fosfolípido, mientras que otras dos hélice  $\alpha$  son expulsadas de la interfase para colocarse por debajo del DPPC (Figura 43).



**Figura 41.** Imágenes de MAB de la monocapa binaria de DPPC/Apo C1 (izquierda) y de DPPC/Apo AII (derecha). Las imágenes muestran como los dominios brillantes se funden conforme incrementa la presión lateral, hasta que los dominios grises terminan cubriendo a toda la monocapa.



**Figura 42.** Modelo para la monocapa binaria DPPC/Apo CI rica en proteína. a) Justo a una presión lateral de entre 9-12  $mN/m$ . b) A una presión de  $\sim 24-31 mN/m$ . c) Altas presiones laterales justo cuando los dominios brillantes se funden. A esta presión la apo CI se coloca perpendicularmente fuera de la interfase aire/agua.



**Figura 43.** Modelo para la monocapa binaria DPPC/Apo All rica en proteína. a) Justo a una presión lateral de entre 9-12  $mN/m$ . b) A una presión de  $\sim 24-31 mN/m$ . c) Altas presiones laterales justo cuando los dominios brillantes se funden. A esta presión la apo All es parcialmente expulsada de la interfase aire/agua.

## Referencias

127. Albrecht O, Gruler H, Sackmann E. Polymorphism of Phospholipid Monolayers. *Journal de Phys (Paris)*. 1978. **39**: 301-313.
128. Amador Kane S y Floyd SD. Interaction of local anesthetics with phospholipids in Langmuir monolayers. *Phys Rev E*. 2000b. **62**: 8400–8408.
129. Amador SM, Compton MA, Wilder N. Interactions determining the growth of chiral domains in phospholipid monolayers: experimental results and computer simulations. *Langmuir*. 2000a. **16**: 8447-8455.
130. Fainerman VB, Zhao J, Vollhardt D, Makievski AV, Li JB. Dynamics of  $\beta$ -lactoglobulin penetration into Langmuir monolayers of 2D condensating Phospholipid. *Phys Chem B*. 1999. **103**: 8998-9007.
131. Kaganer VM, Möhwald H, Dutta P. Structure and phase transitions in Langmuir monolayers. *Rev. Mod. Phys.* 1999. **71**: 779–819.
132. Krasteva N, Vollhardt D, Brzesinski G, Möhwald H. Effect of Sugars and Dimethyl Sulfoxide on the Structure and Phase Behavior of DPPC Monolayers. *Langmuir*. 2001. **17**: 1209-1214.
133. Krüger P, Lösche M. Molecular chirality and domain shapes in lipid monolayers on aqueous surfaces. *Phys Rev E*. 2000. **62**: 7031–7043.
134. McConnell, HM. Structures and Transitions in Lipid Monolayers at the Air-Water Interface. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 1991. **42**: 171-195.
135. Nandi N, Vollhardt D. Molecular Origin of the Chiral Interaction in Biomimetic Systems: Dipalmitoylphosphatidylcholine Langmuir Monolayer. *J Phys Chem B*. 2002. **106**: 10144-10149.
136. Schief WR, Hall SB, Vogel V. Spatially patterned static roughness superimposed on thermal roughness in a condensed phospholipid monolayer. *Phys Rev E*. 2000. **62**: 6831–6837.
137. Sundaram S, Ferri JK, Vollhardt D, Stebe KJ. Surface phase behavior and surface tension evolution for lysozyme adsorption onto clean interfaces and into DPPC monolayers: Theory and Experiment. *Langmuir*. 1998. **14**: 1208-1218.
138. Weis RM, McConnell HM. Cholesterol stabilizes the crystal-liquid interface in phospholipid monolayers. *J Phys Chem*. 1985. **89**: 4453-4459.

139. Wüstneck N, Wustneck R, Fainerman VB, Miller R, Pison U. Interfacial behaviour and mechanical properties of spread lung surfactant protein/lipid layers. **Colloids Surf B Biointerfaces**. 2000. **21**: 191-205.



## Phase Transitions of Phospholipid Monolayers Penetrated by Apolipoproteins

J. Xicohtencatl-Cortes,<sup>†</sup> Jaime Mas-Oliva,<sup>†</sup> and Rolando Castillo<sup>\*‡</sup>*Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Apdo. Postal 70-243, México D. F. 04510, and Instituto de Física, UNAM, Apdo. Postal 20-364, México D. F. 01000**Received: October 1, 2003; In Final Form: February 20, 2004*

Experiments for adsorbing apolipoproteins (CI and AII) on a phospholipid (DPPC, *rac*-1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) monolayer were made. Our results indicate that lipoproteins in fact did not adsorb underneath the DPPC monolayer; instead lipoproteins actually penetrate the DPPC monolayer to form part of the monolayer at the air/water interface. The binary monolayers were isothermally compressed and their textures observed with Brewster angle microscopy. These monolayers that are rich in DPPC present two clear first-order phase transitions between condensed phases, as well as one between a condensed phase and a gas phase. At very high lateral pressures, condensed domains rich in protein present a high reflectivity. These domains melt away as pressure increases, leaving them indistinguishable from the rest of the low-reflectivity optically isotropic monolayer. Apparently, they lose density or thickness as if proteins were expelled from the air/water interface. A model for understanding the phase transitions in these binary systems is presented, which could have important implications in the understanding of lipoprotein physiology.

## Introduction

Important molecules such as cholesterol, triglycerides, and phospholipids that are mostly water insoluble are transported in plasma and mobilized to and from cells throughout lipoprotein particles. Some proteins associated with these particles are known as apolipoproteins (APOs). They apparently give lipoproteins directionality and the ability to interact with receptors at the surface of cells.<sup>1</sup> Several of these APOs can exchange among the different classes of lipoproteins particles, while others form part of the particles as fixed proteins.<sup>2,3</sup> Exchangeable APOs are protein constituents of high-density lipoproteins (HDL).<sup>1</sup> HDL are the mediators for the reverse cholesterol transport, a process that removes excess cholesterol from cell membranes of peripheral tissues resulting in protection against arteriosclerosis.<sup>4–7</sup> Exchangeable APOs, which are membrane active proteins, are generally built of hydrophilic and hydrophobic peptides, which form sequences with highly amphiphilic secondary structural motives. When such proteins are in contact with a biphasic media (polar/nonpolar), their tendency is to anchor their hydrophilic and hydrophobic regions in the polar and the nonpolar media, respectively. Hence, a hydrophobic/hydrophilic interface tends to induce a specific orientation on the adsorbed molecules. Models of lipoprotein particles<sup>8</sup> are basically spheres made of a phospholipid monolayer filled with triglycerides and cholesterol esters, where the phospholipids heads are in contact with the plasma. In these models, APOs are usually placed lying down on the lipoprotein particles.<sup>8,9</sup>

Understanding how the APOs perform their biological function at the surface of the lipoprotein particles has been a lengthy pursued aim, still waiting for answers. Our group has studied the physicochemical behavior of APOs at the air/water interface, as a model for hydrophobic/hydrophilic interfaces,

employing monolayers. Exchangeable APOs present no similarities in their primary structure.<sup>10</sup> However, at a secondary structure level, important similarities appear, mainly due to the presence of amphipathic  $\alpha$ -helices as their main structural motive.<sup>10–12</sup> The amphiphilic character of apolipoproteins is based on the fact that a polar protein face is formed due to the clustering of charged amino acid residues on one side, whereas a hydrophobic surface composed of nonpolar residues is formed at the opposite face of the  $\alpha$ -helix.<sup>10–12</sup> Hydrophobic moment calculations have confirmed the amphiphilic character of APO  $\alpha$ -helices.<sup>10–12</sup> APO CI is composed of 57 amino acid residues in length, with a molecular mass of 6.63 kDa. Two crystalline forms of APO CI have been reported as suitable for high-resolution X-ray diffraction analysis.<sup>13</sup> However, its three-dimensional structure still remains unsolved. Secondary structure predictions, nuclear magnetic resonance, and circular dichroism studies made on APO CI have revealed a high  $\alpha$ -helix content, distributed in two  $\alpha$ -helices.<sup>14–16</sup> The first  $\alpha$ -helix (residues 4–30) presents approximately 7.5 periods (a period = 3.6 amino acids of 5.4 Å pitch), while the second one (residues 35–53) consists of 5.2 periods. APO AII is a protein formed by two identical polypeptide chains bonded by a disulfide bridge at position 6, where each chain corresponds to 77 amino acid residues in length, and a molecular mass of 8.708 kDa.<sup>17</sup> Its three-dimensional structure also remains unsolved. Predictive studies have shown that each chain of the APO AII also presents two  $\alpha$ -helix motifs (peptides encompassing 7–27 and 32–67) as its main secondary structure.<sup>11</sup> When APO CI and APO AII are deposited onto a highly ionic water subphase to form a monolayer, two first-order phase transitions are found on compression.<sup>11,12</sup> The first one involves a condensed fluid phase, which has been denoted as L, coexisting with a low-density gaseous phase (G), where proteins are weakly interacting. The second phase transition involves two condensed phases, the L phase and the LC phase.<sup>11,12</sup> This transition occurs for APO CI at  $\Pi \sim 33 \text{ mN m}^{-1}$  and  $A \sim 350\text{--}600 \text{ \AA}^2 \text{ molecule}^{-1}$ , and for APO AII at  $30\text{--}35 \text{ mN m}^{-1}$  and  $A = 1000\text{--}2500 \text{ \AA}^2$

\* To whom correspondence should be addressed. E-mail: rolandoc@fisica.unam.mx.

<sup>†</sup> Instituto de Fisiología Celular.

<sup>‡</sup> Instituto de Física.

molecule<sup>-1</sup>. A model for both proteins at the air-water interface has been suggested, where APO CI is modeled as two-amphiphilic  $\alpha$ -helices bonded by a loose hinge<sup>12</sup> and APO AII as two-amphiphilic chains bonded at position 6. Here, each chain has two  $\alpha$ -helices, also bonded by a loose hinge.<sup>11</sup> The second phase transition in both proteins is due to a conformational change, where one  $\alpha$ -helix segment in the case of APO CI<sup>12</sup> or two  $\alpha$ -helix segments in the case of APO AII<sup>11</sup> desorb from the subphase. Direct evidence of these conformational changes have been shown using grazing incidence X-ray diffraction and scanning Langmuir-Blodgett of transferred monolayers with atomic force microscopy (AFM).<sup>18</sup>

Isothermal compression of phospholipid monolayers typically produces a sequence of two-dimensional (2D) phases as density increases, starting with a gas (G) phase, a liquid expanded (LE) phase, a tilted condensed (TC) orientationally ordered phase, and an untilted condensed (UC) positionally ordered phase.<sup>19</sup> The TC and UC phases were formerly labeled as liquid condensed and solid, although this last phase is not shown in the particular case of DPPC (*rac*-1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine). Here, the tilting of the alkyl chains is 37°–29° in the TC phase,<sup>20</sup> and the three methyl groups in its big head (~45 Å<sup>2</sup>) prevents a vertical tail arrangement. In phospholipids, phases with free chain rotation along the molecular axes should not exist, since the coupling of two chains prevents rotation. Lateral motion of a molecule requires the movement of two chains, which is hindered, thus reducing the role of translational freedom compared to the internal degrees of freedom of a molecule. Position and orientation of the headgroups can also be involved in ordering, and the interactions between the headgroups can be laterally anisotropic. Until now, X-ray experiments have revealed the order of the aliphatic tails, but not that of the headgroups.<sup>19</sup> In the literature, many studies have been made using DPPC monolayers, involving phase transitions,<sup>21,22</sup> modulated phases,<sup>22</sup> interaction,<sup>23</sup> roughness,<sup>24</sup> chiral structure,<sup>25–27</sup> etc., and also mixed with different compounds.<sup>20,27–32</sup> However, the experimental and the theoretical analysis of penetration of dissolved amphiphiles, like proteins, into the DPPC monolayers, and the effect of protein adsorption on the condensed phases of the monolayers is quite new; a review has been presented recently.<sup>33</sup>

The aim of this study is to go a step forward, studying adsorption and monolayer behavior of the exchangeable apolipoproteins CI and AII in a more realistic interface, from a physiological point of view, than the air/highly ionic water interface. Therefore, we prepared a series of experiments to adsorb APO CI and APO AII on a phospholipid (DPPC) monolayer allocated at the air/water interface; there is no salt addition. Here, we will model the lipoprotein hydrophobic/hydrophilic interface by air (hydrophobic) and water, but with DPPC monolayer separating them. At low lateral pressures, the APOs actually penetrate the DPPC monolayer forming binary monolayers. We compressed the monolayers, and observed them using Brewster angle microscopy (BAM). A model is presented to understand the  $\Pi$ -*A* isotherms and the BAM observations. In this model, when the monolayer is formed by penetration at low lateral pressures, a protein-rich phase is formed by lying-down proteins and tilted DPPC molecules. As lateral pressure is increased, a conformational change is developed in the protein molecules of the protein-rich phase, where one  $\alpha$ -helix of each chain is desorbed from the interface. However, at the end when compression goes forward, the monolayer expels the protein from the interface in a peculiar way.

## Experimental Section

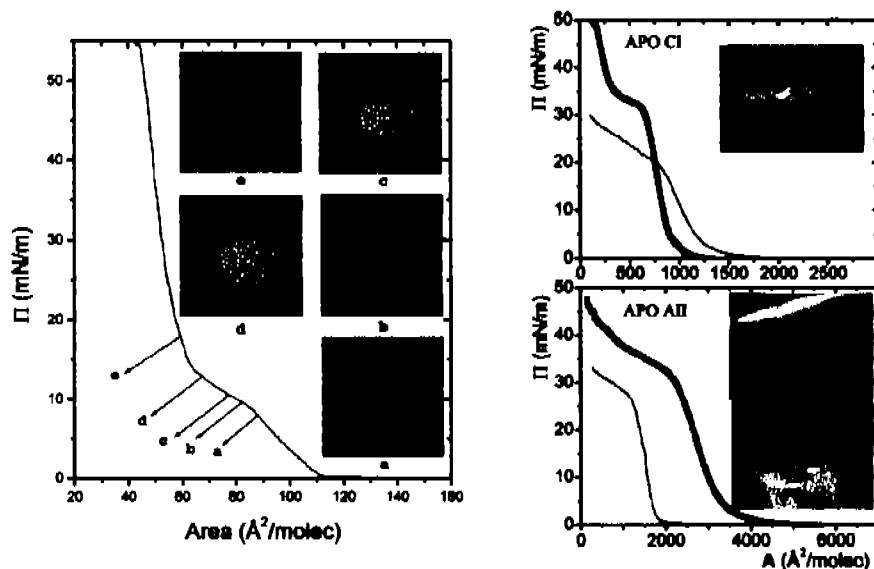
**Reagents.** Lyophilized human APO CI and APO AII (>98%, PerImmune Incorporation, USA) were solubilized in buffered solutions (pH 8.0) to obtain a concentration of 0.2 mg/mL. They were filtered with 0.22  $\mu$ m membrane filters before the experiments were carried out. The subphase was ultrapure water (Nanopure-UV, 18.3 M $\Omega$ ), which was phosphate buffered (sodium phosphate, 99%, Sigma, 20 mM) at pH 8.0. Protein integrity prior to monolayer preparation was done through far-UV circular dichroism,<sup>11,12</sup> and protein concentration was always measured through absorbance measurements.<sup>11,12</sup> DPPC (*rac*-1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) (>99%) was obtained from Fluka Chemie AG. The DPPC was dissolved in chloroform (99% HPLC grade, Aldrich USA) to form the spreading solution (1 mg/mL).

**Monolayer Preparation.** All monolayers were prepared on a computerized Nima LB trough (Model TKB 2410A, Nima Technology Ltd., England) using a Wilhelmy plate to measure the lateral pressure,  $\Pi = \gamma_0 - \gamma$ , i.e., the surface tension difference of the clean subphase and that of the covered subphase. Temperature was kept constant at 25 °C with the aid of a water circulator bath (Cole-Parmer 1268-24, USA). The speed of compression was ca. 50 cm<sup>2</sup>/min. All experiments were carried out in a dust-free environment.

**Preparation of Monolayers of DPPC with APO CI and APO AII.** We used two methods to incorporate the APOs into the DPPC monolayer with similar results. In the first one, which we called the injection method, we gently injected at the bottom of the trough right underneath a preformed DPPC monolayer ~50–250  $\mu$ L of the buffered solution of the APO under study, with the aid of a needle introduced from outside the barriers to disturb as little as possible the DPPC monolayer. After a waiting time in the range of hours to allow proper adsorption, the compression started or the film was expanded to negligible lateral pressure, and after some relaxation time, it was compressed. In the second method, which we called the dissolution and spreading method, we first incorporated the protein in the subphase by dropping an APO buffered solution into the subphase. After 10–15 min, a specific quantity of DPPC was deposited onto the surface, enough to obtain a required DPPC monolayer pressure, by dropping it dissolved in the spreading solution. In seconds, the pressure increased due to the adsorption of protein, to approximately the same value obtained after the long waiting time when the injection method was used. After 10–15 min, the monolayer was expanded to reach a vanishing pressure, and after 30 min for relaxation, the compression process started.

It is important to mention that far-ultraviolet circular dichroism spectra were obtained for both APOs, when they were dispersed in water, to ensure protein integrity along the time taken for these experiments. Over several hours, up to a couple of days, we observed two minimum spectra values. The first one, around 222 nm, corresponded to  $\alpha$ -helix  $n$ - $\pi$  transitions. The second one was around 208 nm and corresponded to both  $\alpha$ -helix  $\pi$ - $\pi^*$  and random coil  $\pi$ - $\pi^*$  transitions. All seemed to indicate that, during the course of the experiments, the secondary structure of the proteins was preserved.

**Brewster Angle Microscopy (BMA).** BAM observations were performed in a BAM1 Plus (Nanofilm Technologie GmbH, Germany), with a spatial resolution ca. 4  $\mu$ m. Here, the interface is illuminated at the Brewster incidence angle (~53°) with a polarized laser beam from a He-Ne laser (632.8 nm). A microscope receives the reflected beam that is analyzed by a



**Figure 1.** Isotherms  $\Pi$  vs  $A$  for monolayers of (A, left panel) DPPC spread onto a phosphate buffered water subphase (pH 8.0), at 25 °C; insets show BAM images at different pressures. (B, right panel) APO CI and APO AII isotherms, at 25 °C. Thick lines, proteins spread onto a highly ionic water subphase; thin lines, proteins spread onto a buffered water subphase (pH 8.0) without DPPC coverage. BAM images correspond to L-LC coexistence. In the case of APO AII the upper image corresponds to the highly ionic subphase and the lower image to the uncovered water subphase. Here, a feature not captured by the images is that, close to the borders of the big bright domains (LC phase), it is easy to see streams of the fluid phase L (dark area) flowing.

polarization analyzer, and the signal is received by a CCD video camera to develop an image of the monolayer.

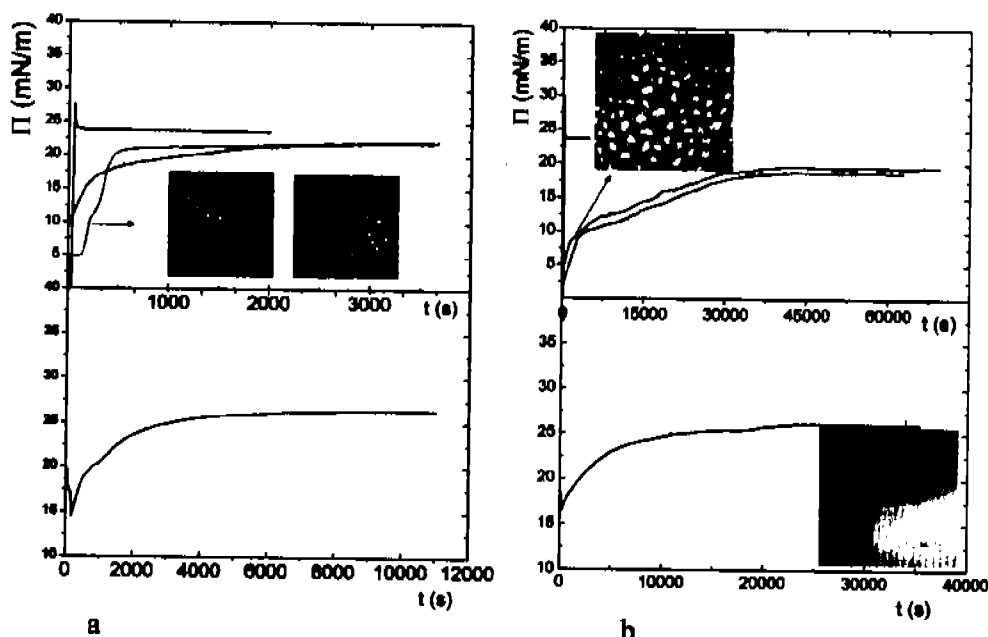
## Results and Discussion

**One-Component Monolayers.** Figure 1A presents a typical isotherm of DPPC monolayer at 25 °C, onto a sodium phosphate buffered water subphase (pH 8.0, 20 mM), presenting two well-known phase transitions: (a) G-L phase transition occurring at  $\Pi \sim 0$  mN  $\text{m}^{-1}$  and (b) LE-LC phase transition at  $\Pi \sim 9$ –12 mN  $\text{m}^{-1}$ ,  $A \sim 65$ –85  $\text{\AA}^2$  molecule $^{-1}$ . Here, small domains appear and coalesce, along the phase transition, which are easily observed with BAM. The resolution of our BAM images did not allow us to observe the characteristic three armed domains commonly observed in this monolayer. The shape of these domains is determined mainly by three contributions to the free energy: line tension, dipolar interaction, and chiral contribution.<sup>28</sup> At  $\Pi \sim 30$  mN  $\text{m}^{-1}$  the monolayer becomes contrastless, and the collapse is at  $\Pi \sim 55$  mN  $\text{m}^{-1}$  and  $A \sim 45$   $\text{\AA}^2$  molecule $^{-1}$ .

APOs form Langmuir monolayers upon the surface of a highly ionic water subphase.<sup>11,12</sup> Figure 1B presents typical isotherms for monolayers of APO CI and of APO AII.<sup>11,12</sup> BAM images (insets Figure 1B) show the fluid phase L (dark domain) coexisting with LC phase (bright domains) in a first-order phase transition, which occurs at relatively high lateral pressure for both proteins. In the bright domains of LC phase that are nucleated from the L phase, one  $\alpha$ -helix of each chain is desorbed from the interface<sup>11,12,18</sup> as mentioned in the Introduction. More details about the APO isotherms can be found elsewhere.<sup>11,12,18</sup> APOs deposited on the air/water (pH 8.0) interface form Gibbs monolayers, because they are water-soluble proteins. For comparison, we included in Figure 1B the APO CI and the APO AII Gibbs isotherms. The contrast among these isotherms and those for monolayers over highly ionic water subphase is evident. APO CI never reaches high lateral pressures and the L/LC phase transition cannot be observed. Although there is a shoulder in the isotherm at  $\Pi \sim 20$  mN  $\text{m}^{-1}$ , nothing

is observed with BAM; a dark gray monolayer is observed all along the compression. APO AII also does not reach high pressures; however, it reaches the L/LC phase transition at  $\Pi \sim 30$  mN  $\text{m}^{-1}$  and can be observed with BAM, as shown in the inset of Figure 1B. As in the case of highly ionic subphase, dark domains correspond to the fluid phase L and bright domains to the condensed LC phase.

**Penetration of Apolipoproteins into the DPPC Monolayers.** When the APOs are injected beneath the preformed DPPC monolayer, they penetrate the DPPC monolayer after some waiting time. Figure 2 shows some examples of the time needed to achieve a stationary state after the injection of the APOs. Here, the lateral pressure reaches a plateau asymptotically and, apparently, no more APO molecules seem to penetrate the DPPC monolayer. Of course, each run has its own rise time due to the specific way and place where the protein was deposited with the needle, under the monolayer. However, in the pressure rise time curves for both proteins, when proteins were injected beneath the DPPC preformed monolayers at  $\Pi \sim 3$  mN  $\text{m}^{-1}$ , there is a breakpoint that corresponds to a phase transition observed with BAM; the phase transition will be described below. It takes roughly between 1/3 and 4 h to reach the plateau ( $\Pi \sim 22$  mN  $\text{m}^{-1}$ ;  $\sim 4.541 \times 10^{15}$  molecules) for APO CI, and approximately 8–10 h for APO AII ( $\Pi \sim 18$  mN  $\text{m}^{-1}$ ;  $\sim 1.729 \times 10^{15}$  molecules). Probably, there are two processes that control the adsorption/penetration of the APOs into the DPPC monolayer. One is related to the transport of the protein to the monolayer (diffusion), and the other is related to the incorporation of the protein at the air/water interface. It seems quite suggestive that the time difference to achieve the stationary state (plateau) in both proteins could be attributed to the fact that APO AII occurs in a dimer and APO CI as a monomer. The dimer is more massive and its diffusion coefficient must be much smaller. In the process of protein incorporation to the interface, hydrophobic interaction with the interface is probably playing an important role. Here, the hydrophobic moment of APO AII (0.415 kcal mol $^{-1}$  residue $^{-1}$ )



**Figure 2.** Penetration of apolipoproteins into DPPC monolayer. (a) APO CI and (b) APO AII. Upper panel in both figures: penetration at  $\Pi \sim 3 \text{ mN m}^{-1}$ . Lower panel: penetration at  $\Pi \sim 20 \text{ mN m}^{-1}$ . Slow growing curves are for penetration by the injection method. Vertical peaks followed by a horizontal line correspond to the dissolution and spread method. Insets are BAM images of the penetrated monolayer at the indicated pressures. In the image on the right for APO CI (upper panel) two domains are clearly seen, one smooth and the other with small bright domains similar to those that appear in the DPPC first-order phase transition.

is slightly lower than the hydrophobic moment of APO CI ( $0.45 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ residue}^{-1}$ ). Another contribution could be of electrostatic origin between the DPPC monolayer and the proteins. At the working pH, although the DPPC monolayer is uncharged, it has a dipolar moment that surely interacts with proteins, which on the average are charged, but with a nonhomogeneous charge distribution, too; APO CI is positively charged, while APO AII is negatively charged. In Figure 2, we also show protein adsorption on DPPC when the APOs are injected beneath a DPPC monolayer at  $\Pi \sim 20 \text{ mN m}^{-1}$ . For both proteins, there was a transition time where lateral pressure slightly decreases first, before starting to increase on the way to reach a plateau after several hours. The limiting pressure is not what was expected if all the protein would have penetrated the DPPC monolayer. As we will see below, there is a second phase transition between condensed phases in these monolayers, at lateral pressures ca.  $24 \text{ mN m}^{-1}$  for APO CI and ca.  $28$  for APO AII. The added protein was enough to pass the phase transition. However, in both monolayers the pressure just reached the onset of the phase transition; pressure never overcame the transition pressure. With BAM, we observed a contrastless monolayer most of the time, except for some cases in APO AII, where it was possible to see some domains with different shades of gray at the onset of the transition.

Figure 2 also shows examples when the dissolution and spreading method was used. Here, the protein-DPPC film is formed in seconds, with a plateau that reaches almost the same lateral pressure as those obtained using the injection method. The spreading of DPPC drives into motion the subphase, and everything seems to indicate that the dissolved protein, through advection, reaches the interface where the DPPC is deposited. It looks like the protein molecules are trapped at the surface. As mentioned in the Experimental Section, it is important to recall that monolayers prepared in this way, after relaxation, produced the same results as those where the injection method

was used. However, in the dissolution and spreading method, the film preparation time is particularly reduced.

**Area Occupied by APO CI and APO AII in DPPC Monolayers.** In this section, we estimate whether all the apolipoprotein injected underneath the DPPC monolayer preformed at  $\Pi \sim 3 \text{ mN m}^{-1}$  completely penetrated the monolayer, leaving no free protein in the subphase. Since the protein quantities used in these experiments are low, a direct quantitative analysis turns out to be impractical. Thus, we used an alternative method to estimate the protein in the monolayer. For both proteins, we prepared a DPPC monolayer at  $\Pi \sim 3 \text{ mN m}^{-1}$ , which occupied a specific area ( $\sim 290 \text{ cm}^2$ ) in the Langmuir trough. Subsequently, a known quantity of protein was injected directly underneath the monolayer and the barriers were allowed to move, maintaining the lateral pressure constant ( $\Pi \sim 3 \text{ mN m}^{-1}$ ) to allow protein penetration. We waited the appropriate time for reaching a limiting area as shown in Figure 3. The area increase due to penetration was compared with the area that would occupy the pure APO deposited on highly ionic water subphase, i.e., area per molecule at  $\Pi \sim 3 \text{ mN m}^{-1}$  as given by its isotherm, multiplied by the number of APO molecules injected in the subphase. For both proteins, we obtained that some protein is not incorporated in the monolayer, in the range of  $\sim 14$ – $15\%$ . Since our binary monolayers are diluted systems (nominal mole fraction,  $X_{\text{DPPC}} = 0.88$ – $0.99$ ), we considered as a good approximation that the partial molar areas of each component in the mixture are the same as the molar areas of pure compounds. It may be important to mention that the use of molecular areas of highly ionic subphases could be a problem. However, we found that APOs behaved like geometric rods when deposited on highly ionic water subphases, approximately of the same sizes as those used in biological studies where proteins are worked in low ionic strength solutions.<sup>12,18</sup> On the other hand, molecular areas that we could obtain from isotherms for APOs on a water surface without DPPC coverage would be

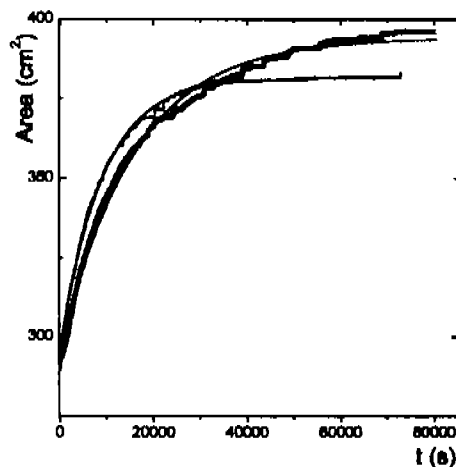


Figure 3. Examples of evolution of area as a function of time at constant pressure ( $\Pi \sim 3 \text{ mN m}^{-1}$ ) for both proteins, at 25 °C. Thick line, APO AII; thin line, APO CI. The fitting curves for the model given by eq 3 are also shown.

incorrect, since as shown above APOs do not form Langmuir monolayers there, and at certain specific pressures, the monolayer area just reveals the equilibrium between proteins in the monolayer and in the subphase. We expect that if there are some differences in size due to the use of data coming from ionic subphases, those will be small. This issue will be finally solved when AFM studies on APO/DPPC transferred monolayers and grazing X-ray diffraction experiments on binary monolayers have been performed. This study is underway. Therefore, we estimate that around 15% of protein did not penetrate the DPPC monolayer at  $\Pi = 3 \text{ mN m}^{-1}$ , probably because APOs are dissolved into the subphase or adsorbed upon the Teflon walls of the trough. Figure 3 presents examples of the evolution of the area as a function of time for both proteins. After ca. 22 h, APO CI reached a limiting area on the average of 401.3  $\text{cm}^2$  and APO AII reached a limiting area on the average of 396.1  $\text{cm}^2$ . Differences in area due to protein penetration were on the average of 113.9  $\text{cm}^2$  for the former and of 106.0  $\text{cm}^2$  for the latter.

The area increase due to the penetration of lipoproteins can be easily modeled. The total monolayer area (DPPC + protein) is  $A' + A^p$ , where  $A'$  is the area previously covered by the DPPC (which is a fixed constant) and  $A^p$  is the area increase due to protein penetration; i.e.,  $A^p = a_p N_{\text{mono}}$ , where  $a_p$  is the area per protein and  $N_{\text{mono}}$  is the number of protein molecules that penetrated the monolayer. We need just two assumptions. The first one is that  $a_p$  is a constant along all the penetration process, if lateral pressure is maintained at a low constant value ( $\Pi = 3 \text{ mN m}^{-1}$ ). Since APOs behave geometrically as rigid rods, each protein that goes to the surface increases the area by a specific amount  $a_p$ .<sup>11,12,18</sup> The second assumption is that the rate of area increase,  $dA^p/dt$ , due to protein penetration, is proportional to the protein concentration in the subphase, i.e.

$$\frac{dA^p}{dt} = k[\text{P}_{\text{sub}}] \quad (1)$$

$[\text{P}_{\text{sub}}] = N_{\text{sub}}/V_{\text{sub}}$  is the concentration of the protein in the subphase,  $N_{\text{sub}}$  is the number of proteins in the subphase, and  $V_{\text{sub}}$  is the subphase volume. The total number of proteins in the system,  $N_T$ , is the sum of the proteins in the subphase plus those in the monolayer,  $N_T = N_{\text{sub}} + N_{\text{mono}}$ . Then, the change

of total area in the trough per unit time is

$$\frac{d}{dt}(A' + A^p) = \frac{dA}{dt} = k[\text{P}_{\text{sub}}] = \frac{d}{dt}(a_p N_{\text{mono}}) = \frac{k(N_T - N_{\text{mono}})}{V_{\text{sub}}}$$

From here, we obtain a first-order differential equation:

$$\frac{dN_{\text{mono}}}{dt} + \frac{k}{a_p V_{\text{sub}}} N_{\text{mono}} = \frac{k}{a_p V_{\text{sub}}} N_T \quad (2)$$

Solving the equation, and multiplying by  $a_p$ , we obtain

$$A^p(t) = a_p N_T + a_p(N_0 - N_T) \exp\{-[k/(a_p V_{\text{sub}})]t\} \quad (3)$$

Here,  $N_0$  is the number of protein molecules in the monolayer at  $t = 0$ . Equation 3 has been used to fit the curves for the area of the penetrated monolayer vs elapsed time such as those presented in Figure 3; the agreement is very good. From the fittings, the  $k$  values are the following:  $6.12 \times 10^{25} \text{ \AA}^5 \text{ s}^{-1} \text{ molecule}^{-1}$  for APO CI and  $13.6 \times 10^{25} \text{ \AA}^5 \text{ s}^{-1} \text{ molecule}^{-1}$  for APO AII. These  $k$  values indicate that APO AII penetrates the DPPC monolayer more readily than APO CI. Hydrophobic moment and subphase diffusion, as mentioned above, suggested that APO CI should perform better. Since constant  $k$  measures the capability of protein incorporation to an interface and consequently the interface-protein interaction, then the results obtained for  $k$  show that those properties do not estimate properly the capability of protein incorporation to an interface.

A different way to support that APO AII interacts stronger with DPPC than APO CI is using the experimental data for protein adsorption with different interfaces, keeping the area for spreading constant. We have observed (data not shown) that the adsorption of APO AII at the air/water interface is not as efficient as when it is covered with DPPC, i.e., equilibrium  $\Pi$  is larger in the latter case; this occurs even at low lateral pressures. In the case of APO CI, the adsorption is similar between the air/water interface and the DPPC-covered interface at low lateral pressures, i.e., below the L/LC phase transition. In both cases, above the L/LC phase transition the DPPC coverage is necessary to maintain the protein at the air/water interface. On the other hand, when a high ionic strength subphase is used, all protein is expelled from the subphase to the air/water interface ( $\Pi$  is even larger in this case), as in a salting-out effect, allowing the formation of a Langmuir monolayer.<sup>12,18</sup>

**Phase Transitions.** DPPC penetrated monolayers were isothermally compressed after an expansion to a vanishing pressure and some waiting time for relaxation. Figure 4 presents the isotherms for the APO CI/DPPC and APO AII/DPPC binary systems, for different quantities of added protein, at 25 °C. As in three-dimensional systems, we do not expect clear-cut phase transitions because our monolayers are binary systems. Therefore, phase transitions occur along a relatively wide range of lateral pressures. In the isotherms, along the compression, three phase transitions are clearly observed in both binary systems. There is a first-order phase transition of not much interest here, between a contrastless binary gas and a binary contrastless liquid phase (L). This transition occurs at  $\Pi \sim 0$ , where the isotherm is horizontal, and ends up at  $A \sim 140\text{--}160 \text{ \AA}^2 \text{ molecule}^{-1}$ , depending on the quantity of added protein.

On compression, the next phase transitions correspond to transitions between condensed phases: A clear kink reveals the start of a phase transition at  $\Pi \sim 8\text{--}11 \text{ mN m}^{-1}$  and densities at  $A = 100\text{--}125 \text{ \AA}^2 \text{ molecule}^{-1}$  depending on the amount of

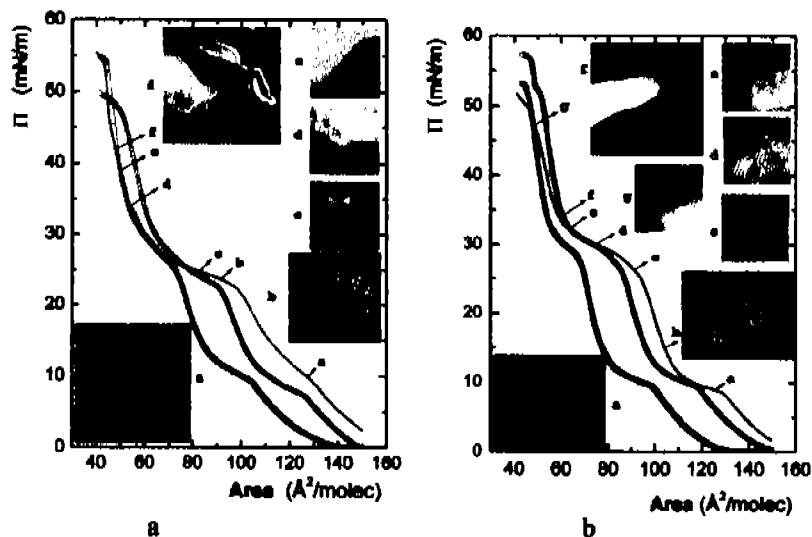


Figure 4.  $\Pi$  vs  $A$  isotherms for (a) DPPC/APO CI (nominal monolayer mole fraction, from left to right:  $X = 0.04, 0.05, 0.12$ ) and (b) DPPC/APO AII (nominal monolayer mole fraction, from left to right:  $X = 0.01, 0.02, 0.03$ ). Insets show BAM images at different lateral pressures.

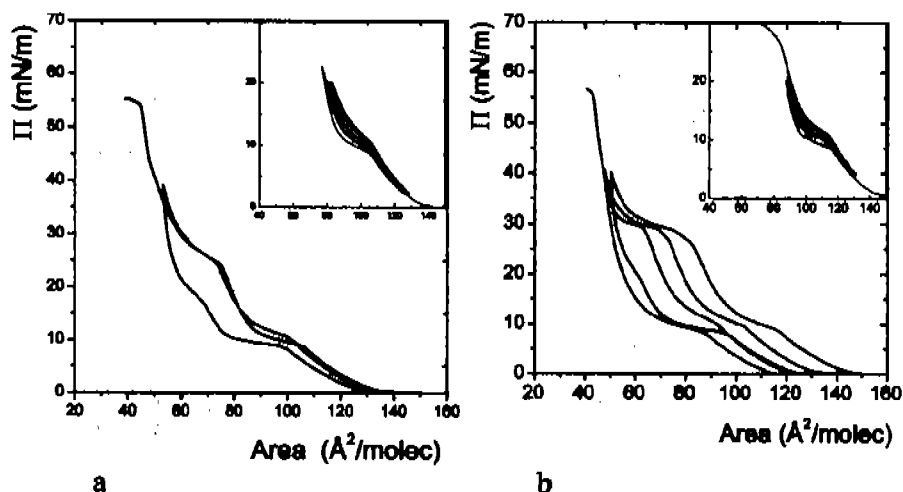
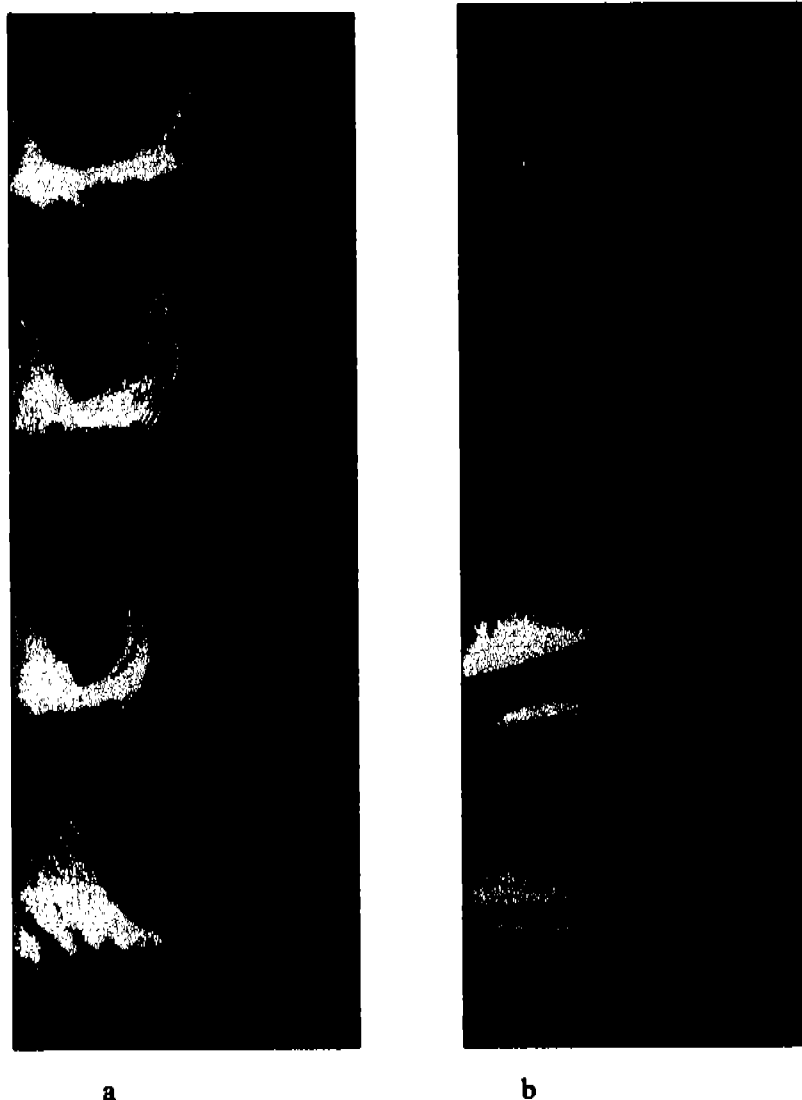


Figure 5. Cycles of compression and decompression for DPPC/APO CI (a) and DPPC/APO AII (b) monolayers.

added protein. BAM images reveal that at the onset of the phase transition solid domains are nucleated from the L phase. These are small domains, very similar to those presented in the phase transition of DPPC at  $9\text{--}12\text{ mN m}^{-1}$ . As pressure increases by a small amount, these phase domains coalesce, forming an extended film with a rough texture; it seems like a wrinkled surface. There is a second kind of phase domains also nucleated from the L phase and made up of contrastless domains. They present a homogeneous texture that forms smooth surfaces. These domains are not abundant along the monolayer. At the onset of phase transition, the metastable L phase is flowing and rapidly disappearing as pressure increases. The gray hue of the smooth domains, similar to that of L phase, is slightly darker than the gray hue of the rough domains. However, as pressure increases, the two kinds of domains can be clearly distinguished. Both kind of domains recall the texture of  $\alpha\text{--}\beta$  phases in 3D binary alloys, where microstructure depends on the specific path followed to get the two phases. Examples of this transition are presented in the upper panel insets of Figure 2 and in Figure 4. As pressure increases, there is another transition that seems to modify just one of the phases. It starts with a pronounced shoulder at  $\Pi \sim 24\text{--}27\text{ mN m}^{-1}$  and  $A = 65\text{--}100\text{ \AA}^2\text{ molecule}^{-1}$  for DPPC/APO CI, and at  $\Pi \sim 28\text{--}31\text{ mN m}^{-1}$

and  $A = 60\text{--}90\text{ \AA}^2\text{ molecule}^{-1}$  for DPPC/APO AII, depending on the quantity of added protein, as shown in the isotherms of Figure 4. In this transition, there is a considerable loss of area per particle. The BAM images reveal that the smooth contrastless domains coming from the previous transition, at the onset of this transition, start to transform from gray to very bright; the rough phase domains seems the same as before the transition, but due to the nonlinear contrast gain of the microscope they appears as dark gray. The phase transitions just described are reversible and reproducible, as can be observed in the cycles of compression and decompression presented in Figure 5 for both proteins. The area per particle change and the reversibility with hysteresis in these phase transformations seem to indicate that they correspond to first-order phase transitions.

As the compression process is carried out, above the phase transitions just described, at  $\Pi \sim 49\text{ mN m}^{-1}$  for DPPC/APO CI and at  $47.5\text{--}49\text{ mN m}^{-1}$  for DPPC/APO AII, the bright domains melt away leaving only dark gray domains in all the field of view. Without the bright domains as a contrast, all the field of view takes on a light gray hue as before the phase transition; see Figure 6. This hue of gray is similar to that of pure DPPC monolayers at this lateral pressure. This process that is like another phase transition is reversible, although

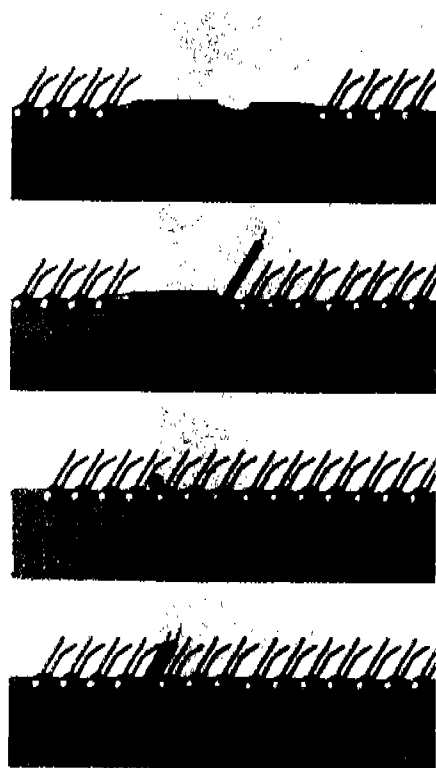


**Figure 6.** BAM images of bright domains melting away. The dark gray domain ends up covering all the field of view. DPPC/APO CI (a) and DPPC/APO AII (b).

difficult to be studied, because it is close to the collapse and the isotherm is quite steep there. We will discuss this later.

An interpretation of the events just described along the compression can be given taking into account on one hand that DPPC is an amphiphile with a bulk hydrophilic head and two long hydrophobic tails, and on the other hand that both proteins have been previously modeled.<sup>11,12,18</sup> APO CI presents two-amphiphilic  $\alpha$ -helices of approximately 28.5 and 40.5 Å in length bonded by a loose hinge, and APO AII presents two-amphiphilic chain  $\alpha$ -helices bonded at position 6, where each chain has two  $\alpha$ -helices also bonded by a loose hinge, of approximately 31.5 and 54 Å in length. At pressures below  $\Pi \sim 10 \text{ mN m}^{-1}$ , i.e., in the L phase, the proteins and the DPPC molecules form an isotropic liquid mixture, where the protein molecules are traveling in a landscape of close energy minimum configurations, where the different protein configurations have the restriction of being laid down along the long axis of the  $\alpha$ -helices on the subphase; the tails of DPPC are correlated probably as in the L pure DPPC monolayer. The hydrophilic faces of the  $\alpha$ -helices and the heads of the DPPC must be in contact with the water subphase, and the hydrophobic faces and the DPPC tails must be oriented toward the air. Here, at low

lateral pressures, the area covered by the DPPC/APO monolayer is roughly the sum of the areas covered by the molecules of protein and of DPPC, as in their pure state, as shown before. Along the phase transition, at  $\Pi \sim 10 \text{ mN m}^{-1}$ , two phase domains are formed. One is formed by the coalescence of small domains, which are very similar to those observed in the pure DPPC monolayer and probably rich in DPPC. These domains have a rough texture in BAM images, resembling the pure DPPC texture. The second kind of less abundant domains has a smooth texture and forms a phase that is probably rich in protein. The DPPC molecules in the rough domains are probably tilted and orientationally ordered, and the  $\alpha$ -helices in the smooth domains are lying down on the water surface (Figure 7). In the next phase transition,  $\sim 24\text{--}31 \text{ mN m}^{-1}$  depending on the protein content, a big change of area per particle starts. Here, the rough phase domains leave its reflectivity almost without change, revealing that the DPPC chain tilting has not changed too much. However, the smooth phase domains become very bright. Taking into account that the BAM reflectivity formula is a quadratic function on the film thickness, and the desorbing behavior of APOs in pure monolayers on a highly ionic subphase at about the same lateral pressures, it is quite possible that the protein molecules



**Figure 7.** Model for the binary monolayer. From upper panel to lower panel: (a) Model for the smooth domains rich in protein above the phase transition that occurs  $\sim 9\text{--}12\text{ mN m}^{-1}$ ; (b) Model for protein-rich domains above the phase transition that occurs  $\sim 24\text{--}31\text{ mN m}^{-1}$ . Model for the dark gray domain covering all the field of view in the BAM images, after the melting away of the bright domains: (c) APO CI oriented parallel to the air/water interface; (d) APO AII partially expelled from the air/water interface.

suffer a conformational change also in this binary system. APO monolayers on a highly ionic subphase, above the L/LC phase transition,<sup>18</sup> present a diffraction peak at  $q_z \neq 0$  for the case of APO CI, indicating that the order goes only in one direction, with an arrangement of rows formed by desorbed tilted  $\alpha$ -helices and rows of  $\alpha$ -helices parallel to the surface, at the water/air interface.  $q_z$  is the momentum transfer vector in the vertical direction. APO AII presents an arrangement of rows of desorbed tilted  $\alpha$ -helices and  $\alpha$ -helices parallel to the surface. This arrangement exhibited two diffraction peaks: one is associated with the tilted helix order ( $q_z \neq 0$ ), and the other is associated with the order between rows formed by the  $\alpha$ -helices lying down on the surface. In the present case of DPPC-covered water/air interface, one  $\alpha$ -helix segment (APO CI) or two  $\alpha$ -helix segments (APO AII) could desorb from the subphase, aligning them following the tilting of the DPPC tails. This could explain the large area loss in the isotherms and the brightness of the smooth domains (Figure 7). A rough estimate of the area lost along the whole transition is consistent with the desorption.

The most difficult point to be explained is related to the events that occurred afterward, i.e., when the brilliant smooth phase domains melt away. Here, it looks like as if the monolayer loses film thickness and, at the end, the reflectivity of the monolayer seems similar to that of domains rich in DPPC. The only solution to explain the thickness lost is that the monolayer pushes the protein from the air/water interface. Evidence of this fact is that the area per molecule at the collapse, for the binary monolayers of both proteins, is very close to the area per molecule for the collapse of pure DPPC monolayer; see Figures 4 and 1A. If

this is a phase transition, it is a peculiar transition between a 2D monolayer and a 3D structure, which occurs in a continuous form. However, if proteins are expelled into the subphase or into air, without any constraint, they could have the  $\alpha$ -helix faces incorrectly exposed to air or to water, i.e., hydrophobic faces exposed to the DPPC tails and hydrophilic faces exposed to air (protein expelled into air) or hydrophilic faces close to the DPPC heads and hydrophobic faces exposed to water (protein expelled into the subphase). It is difficult to predict if a change in reflectivity can be observed in the domains after the expulsion of the proteins. However, as mentioned before, there are no reflectivity differences in BAM images along the field of view. On the other hand, there could be an intermediate possibility; this can be observed in our model in Figure 7. Here, when APO CI molecules are expelled from the air/water interface, they recover their unbent conformation leaving the interface to be allocated just above the heads and between the tails of the DPPC amphiphiles. The required space for allocating a rod (protein) between the DPPC lattice is the diameter of an  $\alpha$ -helix, i.e.,  $\sim 5\text{ \AA}$ . Given the big size of the DPPC heads, this probably introduces just a small defect in the tilted-condensed orientationally ordered DPPC phase. However, the DPPC molecules just surrounding the incorporated rods probably would be highly distorted. Until now the order of phospholipid heads has been unknown, but among the expected arrangements there are several that could not be distorted much by including an  $\alpha$ -helix rod as proposed.<sup>35</sup> In this way, the hydrophilic faces of the proteins are interacting with the heads and the hydrophobic faces with the tails. The case of APO AII is more difficult to explain. Here, we suspect that the protein is expelled from the water/air interface in a very peculiar way; since it has two chains, the way of expulsion proposed for APO CI would distort the DPPC lattice too much. Therefore, we propose that two  $\alpha$ -helices still are tilted, but the other two  $\alpha$ -helices are expelled from the interface to be allocated beneath the monolayer as shown in Figure 7. Here a little twisting of the horizontal chains could make the hydrophobic faces hidden to avoid direct contact with the subphase.

## Conclusion

We have studied binary systems made up of an apolipoprotein and phospholipid. We found that these systems present two phase transitions at high lateral pressure and have presented a model to understand them. In this model, in the protein-rich domains, protein is lying down upon the air/water interface in the L phase. As pressure increases, there is a phase transition where  $\alpha$ -helices desorb from the interface following the DPPC tilting. When lateral pressure is increased even more, protein seems to be squeezed from the phospholipid monolayer in a peculiar way, as in the case of APO AII, or it could be still there modifying the DPPC monolayer structure, as in the case of APO CI. Since these processes at high lateral pressures are not completely understood, grazing incidence X-ray diffraction and atomic force microscopic observation of Langmuir-Blodgett films of transferred monolayers are indispensable. These studies are underway. The important biological implications of this work could be directly related to the physiological function of lipoproteins. First, the location of the APOs in the lipoprotein particles could be associated with the lateral pressure in the surface of these particles. Second, the conformational structure of the APOs present in the lipoprotein particles could also be related to the lateral pressure in these particles. Third, there could be a process using the lateral pressure along the maturation of lipoproteins that could control the position and conformational structure of the APOs in the lipoprotein particle.



**Acknowledgment.** We acknowledge the technical help in running the isotherms and BAM observations of S. Ramos and the technical support of B. Delgado-Coello and C. Garza. Financial support provided by CONACYT (36680-E and PMB) and DGAPA-UNAM grants (IN 212301, IN113601).

### References and Notes

- (1) Despres, J. P.; Lemieux, I.; Dagenais, G. R.; Cantin, B.; Lamarche, B. *Atherosclerosis* **2000**, *153*, 263.
- (2) Segrest, J. P.; Jones, M. K.; De Loof, H.; Dashti, N. *J. Lipid Res.* **2001**, *42*, 1346.
- (3) Segrest, J. P.; Jones, M. K.; De Loof, H.; Brouillette, C. G.; Venkatalapathi, Y. V.; Anantharamaiah, G. M. *J. Lipid Res.* **1992**, *33*, 141.
- (4) Stein, O.; Stein, Y. *Atherosclerosis* **1999**, *144*, 285.
- (5) Hajjar, K. A.; Nachman, R. I. *Annu. Rev. Med.* **1996**, *47*, 423.
- (6) Plutzky, J. *Curr. Opin. Cardiol.* **2000**, *15*, 416.
- (7) Yokoyama, S. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1392*, 1.
- (8) Borhani, D. W.; Rogers, D. P.; Engler, J. A.; Brouillette, C. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, *94*, 12291.
- (9) Mehta, R.; Gantz, D. L.; Guraky, O. *Biochemistry* **2003**, *42*, 4751.
- (10) Bolaños-García, V. M.; Soriano-García, M.; Mas-Oliva, J. *Mol. Cell. Biochem.* **1997**, *175*, 1.
- (11) Bolaños-García, V. M.; Ramos, S.; Castillo, R.; Xicohtencatl-Cortés, J.; Mas-Oliva, J. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 5757.
- (12) Bolaños-García, V. M.; Mas-Oliva, J.; Ramos, S.; Castillo, R. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 6236.
- (13) Weisgraber, K. H.; Newhouse, Y. M.; McPherson, A. *J. Mol. Biol.* **1994**, *236*, 382.
- (15) Rozek, A.; Buchko, G. W.; Cushtley, R. *J. Biochemistry* **1995**, *34*, 7401-7408.
- (16) Buchko, G. W.; Rozek, A.; Zhong, Q.; Cushtley, R. *J. Pept. Res.* **1995**, *8*, 86.
- (17) Brewer, H. B.; Lux, S. E.; Ronan, R.; John, K. M. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **1972**, *69*, 1304.
- (18) Ruiz-García, J.; Moreno, A.; Brezesinski, G.; Möhwald, H.; Mas-Oliva, J.; Castillo, R. *J. Chem. Phys.* **2003**, *117*, 11117.
- (19) Kaganer, V. M.; Möhwald, H.; Dutta P. *Rev. Mod. Phys.* **1999**, *71*, 779.
- (20) Krasteva, N.; Vollhardt, D.; Brezesinski, G.; Möhwald, H. *Langmuir* **2001**, *17*, 1209.
- (21) Albrecht, O.; Gruler, H.; Sackmann, E. *J. Phys. (Paris)* **1978**, *39*, 301.
- (22) McConnell, H. M. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1991**, *42*, 171.
- (23) Nandi, N.; Vollhardt, D. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 10144.
- (24) Schief, W. R.; Hall, S. B.; Vogel, V. *Phys. Rev. E* **2000**, *62*, 6831.
- (25) Weiss, R. M.; McConnell, H. M. *J. Phys. Chem.* **1985**, *89*, 4453.
- (26) Amador Kane, S.; Compton, M.; Wilder, N. *Langmuir* **2000**, *16*, 6447.
- (27) Kruger, P.; Lösche, M. *Phys. Rev. E* **2000**, *62*, 7031.
- (28) Weiss, R. M.; McConnell, H. M. *J. Phys. Chem.* **1985**, *89*, 4453.
- (29) Wüstneck, N.; Wüstneck, R.; Fainerman, V. B.; Miller, R.; Pison, U. *Colloids Surf. B* **2001**, *21*, 191.
- (30) Amador Kane, S.; Floyd, S. D. *Phys. Rev. E* **2000**, *62*, 8400.
- (31) Sundaram, S.; Ferri, J. K.; Vollhardt, D.; Stebe, K. *J. Langmuir* **1998**, *14*, 1208.
- (32) Fainerman, V. B.; Zhao, J.; Vollhardt, D.; Maklevski, A. V.; Li, J. B. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 8998.
- (33) Vollhardt, D.; Fainerman, V. B. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2000**, *86*, 103.

***DISCUSION GENERAL Y PERSPECTIVAS***

El mecanismo de intercambio de las apolipoproteínas intercambiables entre partículas lipoproteicas sigue siendo una pregunta a discusión. Sin embargo, con fundamento en el trabajo realizado en nuestro laboratorio durante los últimos años, consideramos que estos mecanismos se fundamentan en las propiedades de las hélices  $\alpha$  anfipáticas contenidas en las apolipoproteínas, en el número de copias de apolipoproteínas presentes en la superficie de las lipoproteínas, así como en los cambios de tensión superficial debido al tamaño y/o forma de las lipoproteínas. Las partículas HDL sintetizadas por hepatocitos y enterocitos como partículas en forma de discos, contienen una cantidad mínima de colesterol libre, no presentan ésteres de colesterol y son ricas en apolipoproteínas. Estas proteínas forman un 50 % de la masa total de estas partículas lipoproteicas.

El estudio de las apolipoproteínas en ausencia y presencia de lípidos ha sido de gran importancia para explicar tanto el flujo de colesterol de las membranas, como la transferencia de colesterol entre partículas LDL y HDL. De igual forma, cuando la apo AI se encuentra asociada a lípidos funciona como el principal activador de la LCAT (Sorci-Thomas y col., 1998). Durante esta activación, la captura de colesterol parece estar asociada a un concomitante flujo de fosfolípidos de membrana.

Las partículas HDL discoidales son consideradas como especies transientes y se encuentran en equilibrio con partículas HDL esféricas o maduras. Durante el proceso de maduración los fosfolípidos se organizan como partículas discoidales rodeadas en su región hidrocarbonada por la apo AI, mientras que la LCAT es la responsable de transformar la HDL discoidal en HDL esférica a medida que el colesterol comienza a moverse como éster de colesterol de la superficie al núcleo de la partícula (Wang 2002; Clay y col., 1999). En los últimos años se han propuesto dos modelos para la estructura de la HDL discoidal, los modelos "Picket Fence" y "belt" incluyendo a la variante de "Hairpin" (Narayanaswami y col., 2004; Kol y Segrest 2002; Rogers y col., 1998), ambos con sus propios puntos a favor y en contra. Sin embargo, estos modelos aún no han sido capaces de responder las preguntas estructurales claves, que pudieran explicar el destino de las HDL en plasma. Durante los últimos años en el laboratorio del Dr. Mas-Oliva se ha estudiado de manera intensiva la estructura de las apolipoproteínas, con el propósito de definir las características clave que permitan explicar fenómenos básicos, tales como el reconocimiento a receptores y la actividad de transferencia de lípidos llevada a cabo por las apolipoproteínas intercambiables. Estos estudios han consistido

en definir cambios de conformación de las apolipoproteínas en interfases aire/agua y lípido/agua; con la finalidad de obtener una idea aproximada de los cambios estructurales que pudieran explicar este fenómeno. Esto se ha logrado empleando monocapas de Langmuir, las cuales han sido estudiadas mediante MAB, MFA, incidencia de rayos de X rasantes (Bolaños-García y col., 1999; Bolaños-García y col., 2001; Ruiz-García y col., 2003; Xicohtencatl-Cortes y col., 2004) y análisis de fuerzas de superficie (Campos-Terán y col., 2004).

De acuerdo con nuestros resultados, las apolipoproteínas AI, AII, CI y CIII, independientemente de sus diferencias de tamaño y contenido de hélice  $\alpha$  anfipática en cada una de ellas, cuando se colocan en una interfase aire/agua y se comprimen lateralmente muestran cambios estructurales importantes detectadas en un intervalo amplio de presiones laterales de entre 3-35  $mN/m$  y cambios de área de 100-2500  $\text{Å}^2/\text{molécula}$  (Bolaños-García y col., 1999; Bolaños-García y col., 2001). Estos cambios pueden ser detectados por MAB y por difracción de rayos X de fuente sincrotrón de incidencia rasante (Ruiz-García y col., 2003). Al considerar las diferencias estructurales entre las diferentes apolipoproteínas así como el tamaño y el número de regiones hélice  $\alpha$  anfipática en relación con su estado monomérico o dimérico, resulta interesante observar como las diferentes regiones helicoidales de las apolipoproteínas intercambiables se disponen en el plano de la interfase aire/agua. Sin embargo, durante la compresión lateral de la monocapa se observa una considerable pérdida de área en las isotermas típicas y cambios de contraste en las imágenes de MAB, sugiriendo el desprendimiento de un segmento hélice  $\alpha$  de la interfase para orientarse hacia el aire. Datos recientes revelan una interesante propiedad de las monocapas de Langmuir binarias de DPPC/apolipoproteínas en la interfase aire/agua, mostrando que las apolipoproteínas CI y AII cuando son inyectadas en la subfase difunden y penetran a la monocapa de DPPC (Xicohtencatl-Cortes y col., 2004). Durante la compresión lateral de la monocapa binaria se observan diferentes transiciones de fase, una transición asociada a las monocapas de fosfolípidos a una  $\Pi$ -8-11  $mN/m$  y a  $\sim$ 110-125  $\text{Å}^2/\text{molécula}$ . Con un incremento mayor en la presión lateral se presenta otra transición de fase asociada a las proteínas, a  $\Pi$ -33  $mN/m$  y a  $\sim$ 350-600  $\text{Å}^2/\text{molécula}$  para la apo CI y  $\Pi$ -30-35  $mN/m$ , y a  $\sim$ 1000-2500  $\text{Å}^2/\text{molécula}$  para la apo AII (Xicohtencatl-Cortes y col., 2004). Los análisis con MAB realizados para cada uno de estos experimentos

demuestran el hecho de que segmentos específicos de hélice  $\alpha$  en ambas apolipoproteínas cambian de ángulo y penetran la monocapa de DPPC.

Pensamos que los cambios conformacionales observados en las monocapas de las apolipoproteínas CI y AII durante la compresión lateral, pudieran guardar una relación directa con los cambios de tensión superficial de estas proteínas en la superficie de las lipoproteínas. De esta forma, en respuesta a cambios de tensión superficial de la partícula lipoproteica, las apolipoproteínas podrían presentar cambios de estructura.

Resulta interesante como nuestra hipótesis de trabajo es de relevancia cuando se extrapolan los cambios conformacionales observados en interfaces aire/agua y lípido/agua a la superficie de una partícula lipoproteica (Mas-Oliva y col., 2003; 2004). En este caso, debido al pequeño tamaño y a la rica composición en proteínas de las HDLs discoidales (pre  $\beta$ -2HDL), se propone que la presión lateral en las monocapas de fosfolípidos de estas partículas que interaccionan con las diferentes apolipoproteínas (apolipoproteínas AI, AII, CI y E3) y otras proteínas (LCAT, CETP, PLTP), muy probablemente sea alta y sólo disminuye en paralelo a los cambios en tamaño y forma de estas lipoproteínas cuando comienzan a acumular ésteres de colesterol para formar HDL esféricas ( $\alpha$ -HDL).

Con base a cálculos teóricos es posible investigar los probables cambios en tamaño y forma de las HDLs nacientes, discoidales y esféricas o maduras, al mostrar los valores obtenidos del área a partir de las hélices de las diferentes apolipoproteínas en la superficie de las partículas de HDL. Los resultados obtenidos del estudio de las apolipoproteínas en las interfases aire/agua y lípido/agua permiten postular que la presión lateral de la monocapa de fosfolípidos asociada a proteínas en la superficie de las diferentes partículas de HDL, podrían ser muy diferentes dependiendo de su tamaño y forma (Mas-Oliva y col., 2003; Xicohtencatl-Cortes y col., 2004). Consideramos que este fenómeno podría definir la estructura de las apolipoproteínas y por consiguiente su función específica para dirigir el destino de partículas HDL en el plasma. El hecho de que estas apolipoproteínas pudieran presentar una diferente conformación en las lipoproteínas recién sintetizadas con formas discoidales a cuando se encuentran en un estado maduro con forma esférica podría ser un dato importante en el entendimiento de sus propiedades fisiológicas como lo son direccionalidad y reconocimiento a receptores.

Nuestra propuesta pudiera estar relacionada con los mecanismos de asociación que presenta la apo AI durante su interacción con partículas HDL discoidales o esféricas (Fielding y Fielding 1995), o cuando la apo CI modula la interacción de apo E con partículas VLDL de tipo  $\beta$  (Weisgraber y col., 1990).

De igual forma, la posibilidad de la existencia en estas apolipoproteínas de un estado intermedio o glóbulo fundido debe ser estudiado, ya que existen ejemplos de proteínas que desdoblán parcialmente cerca de la superficie de la membrana (Lala y col., 1995; Banuelos y Muga 1995), así como de estudios de desdoblamiento por calor de la apo AI en ausencia de lípidos (Gursky y Atkinson 1996). Si consideramos a una partícula de HDL del tipo discoidal como un cilindro compuesto de una bicapa de fosfolípidos con un diámetro promedio de 75 Å por 30 Å altura, el área lateral disponible calculada corresponde a 7068.5 Å<sup>2</sup>. Tomando en cuenta el área de la base y la tapa de este cilindro, el área total promedio se incrementa a 15904.3 Å<sup>2</sup>. No obstante, de acuerdo al modelo propuesto del doble cinturón, se ha postulado que la orientación de la apo AI en las partículas discoidales interaccionan básicamente en su región hidrofóbica. Considerando a la apo AI como una molécula de 319.5 Å de longitud por 5 Å de diámetro, el área proyectada para dos moléculas de apo AI es del orden de 3195 Å<sup>2</sup>, la cual cubriría únicamente el área lateral de la HDL discoidal. Por lo tanto, este cálculo apoya el hecho de que el cilindro debe ser distorsionado en forma de una pildora y no un cilindro perfecto, de tal manera que las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos evitan entrar en contacto con la superficie hidrofílica del medio ambiente. En este modelo, de una manera confinada el área de la base y de la tapa, estarían en condiciones de poder ser ocupadas por otras apolipoproteínas intercambiables junto con la CETP, PLTP y LCAT.

Cuando estas partículas HDL crecen de una forma discoidal a una forma esférica, alcanzan un diámetro promedio de 12 nm y el área de superficie se incrementa hasta 45239 Å<sup>2</sup>, siendo aproximadamente tres veces más grande que el área observada en las partículas discoidales. Por consiguiente, dependiendo del número de copias de apolipoproteínas asociadas a estas partículas maduras, se ha considerado que la relación lípido/proteína aumenta a expensas de la incorporación de lípidos a estas partículas. Primero, se puede asumir que la presión lateral entre las apolipoproteínas en la superficie de la partícula esférica cambia considerablemente permitiendo una exposición más eficaz de las regiones  $\alpha$  de apolipoproteínas en su

superficie. Segundo, apolipoproteínas como la apo AI ahora localizadas en la superficie de las partículas esféricas pudieran adquirir una orientación rotacional preferente en relación con las moléculas de los fosfolípidos (Klon y col., 2002a; Klon 2000b). Esta última posibilidad, se apoya en la propuesta que se tiene de la apo AI, al ajustar sus interacciones intermoleculares cuando la partícula HDL cambia de una forma discoidal a una forma esférica (Rogers y col., 1998).

Con base en los resultados obtenidos que sustentan nuestra hipótesis de trabajo, consideramos que esta primera etapa de nuestra propuesta de investigación ha sido exitosa.

Péptidos modelo sintetizados *in vitro* y diseñados con la finalidad de “congelar” a estas moléculas en las dos estructuras claves de nuestra propuesta, serán seleccionados con base a su estabilidad para su posterior utilización en la preparación de lipoproteínas artificiales. Sin duda, esta estrategia será de gran importancia en la comprobación de nuestra hipótesis de trabajo al momento de estudiar las características de estos péptidos modelo colocados en la superficie de lipoproteínas artificiales, en el reconocimiento a receptores así como en su capacidad de transferencia de lípidos.

## Referencias

140. Banuelos S, Muga A. Binding of molten globule-like conformations to lipid bilayers. Structure of native and partially folded alpha-lactalbumin bound to model membranes. *J Biol Chem*. 1995; **170**: 29910-29915.
141. Bolaños-García VM, Ramos S, Xicohtencatl-Cortés J, Castillo R, Mas-Oliva J. Monolayers of apolipoproteins at the air/water interface. *J Phys Chem B*. 2001; **105**: 5757-5765.
142. Campos-Terán J, Mas-Oliva J, Castillo R. Interaction and conformations of  $\alpha$ -helical human apolipoprotein C1 on hydrophobic and hydrophilic substrates. *J Phys Chem B*. 2004. En prensa.
143. Clay MA, Cehic DA, Pyle DH, Rye KA, Barter PJ. Formation of apolipoprotein-specific high-density lipoprotein particles from lipid-free apolipoproteins A-I and A-II. *Biochem J*. 1999; **337**: 445-451.
144. Klon AE, Segrest JP, Harvey SC. Comparative models for human apolipoprotein A-I bound to lipid in discoidal high-density lipoprotein particles. *Biochemistry*. 2002a; **41**: 10895-10905.
145. Klon AE, Segrest JP, Harvey SC. Molecular dynamics simulations on discoidal HDL particles suggest a mechanism for rotation in the Apo A-I belt model. *J Mol Biol*. 2002b; **324**: 703-721.
146. Lala AK, Kaul P, Ratnam PB. Membrane-protein interaction and the molten globule state: interaction of alpha-lactalbumin with membranes. *J Protein Chem*. 1995; **14**: 601-609.
147. Mas-Oliva J, Moreno A, Ramos S, Xicohtencatl-Cortés J, Campos J, Castillo R. Monolayers of apolipoprotein AII at the air/water interface, in: N.S. Dhalla, N.S. et al (Eds). *Frontiers in Cardiovascular Health*. Kluwer Academic Publishers. 2003. pp. 341-352.
148. Narayanaswami V, Maiorano JN, Dhanasekaran P, Ryan RO, Phillips MC, Lund-Katz S, Davidson WS. Helix orientation of the functional domains in apolipoprotein E in discoidal high density lipoprotein particles. *J Biol Chem*. 2004; **79**: 14273-14279.



149. Rogers DP, Roberts LM, Lebowitz J, Datta G, Anantharamaiah GM, Engler JA, Brouillette CG. The lipid-free structure of apolipoprotein A-I: effects of amino-terminal deletions. *Biochemistry*. 1998. **37**: 11714–11725.
150. Wang G. How the lipid-free structure of the N-terminal truncated human apoA-I converts to the lipid-bound form: new insights from NMR and X-ray structural comparison. *FEBS Lett*. 2002. **529**: 157-161.
151. Xicohtencatl-Cortes J, Mas-Oliva J, Castillo R. Phase transitions of phospholipid monolayers penetrated by apolipoproteins. *J Phys Chem B*. 2004. **108**: 7307-7315.



## Breakthroughs and Views

## In search of new structural states of exchangeable apolipoproteins

J. Xicohtencatl-Cortes<sup>a</sup>, R. Castillo<sup>b</sup>, J. Mas-Oliva<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, D.F., Mexico<sup>b</sup> Instituto de Física, Universidad Nacional Autónoma de México, 01000 México, D.F., Mexico

Received 31 August 2004

Available online 2 October 2004

**Abstract**

Based upon state of the art biophysical experimentation, this article focuses on the different structural arrangements exchangeable apolipoproteins achieve when placed on Langmuir monolayers and subjected to changes in lateral pressure. We have studied the monolayers of apolipoproteins CI, CIII, AI, AII, and E that show as secondary structure a high percentage of amphipathic  $\alpha$ -helix. This has been achieved employing techniques such as Brewster angle microscopy, synchrotron X-ray diffraction, and surface pressure measurements. In addition, the lateral order of protein arrays has been also studied by atomic force microscopy. These monolayers show that a phase transition from a two-dimensional disorder fluid to an ordered state is detected at relatively high lateral pressure, where unusual one-dimensional solid phases are discovered. While several helices that conform the apolipoprotein are confined to the interface, others are uniformly tilted toward the hydrophobic air or the phospholipid fatty acid chains. Our results suggest that a similar ordering might also occur when these apolipoproteins are attached to a lipoprotein particle such as a high density lipoprotein (HDL) particle. Therefore, changes from a nascent or discoidal HDL to a mature spherical HDL might in parallel involve structural changes as those described in our Langmuir interfaces. Current experimentation is being carried out in order to elucidate if the structural states already found are related to the efficiency of lipid transfer between lipoprotein particles or lipoproteins and the plasma membrane of cells, as well as receptor ligand recognition.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Apolipoprotein; Monolayer;  $\alpha$ -Helix; Lipoprotein; Interface

Lipoproteins circulating in the plasma of vertebrates and several species of invertebrates constitute non-covalent complexes of lipid and protein. Water insoluble molecules such as cholesterol, triacylglycerols, and phospholipids are transported in plasma and mobilized to and from cells in the form of lipoproteins. One of the most intriguing classes of lipoproteins is the high-density lipoprotein fraction (HDL), involved in reverse cholesterol transport (RCT) [1], a process that removes excess cholesterol from cell membranes, and is therefore proposed as a mechanism of protection against atherosclerosis [2–6]. The HDL fraction constitutes the smallest and densest of the lipoproteins. This fraction is com-

posed of phospholipids, cholesterol, cholesterol esters, and importantly by a series of proteins called apolipoproteins (apos). ApoAI forms the major protein component of HDLs with around 70% of the total protein mass [7]. Another important component is apoAII together with varying amounts of apoCI, apoCII, apoCIII, and apoE [8,9]. These apolipoproteins called exchangeable due to their property to move between the different classes of lipoproteins apparently give lipoproteins directionality and the ability to interact with receptors at the surface of cells. The scavenger receptor class B type 1 (SR-B1) [10] and the ATP binding cassette protein (ABCA-1) [11] have been proposed as important receptor molecules for the HDLs. Together with these two molecules, interactions of apolipoproteins with enzymes like the lecithin cholesterol acyl transferase (LCAT) [12],

\* Corresponding author. Fax: +525 56225611.

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

and lipid transfer proteins such as the cholesterol ester transfer protein (CETP) [13] together with the phospholipid transfer protein (PLTP) [14], contribute to HDL remodeling. While the interaction of apoAI with SR-B1 and ABCA-1 has been thoroughly discussed in the last few years, the role apoAII, apoCI, and apoE play in this remodeling process still remains an open question.

Although functional studies performed on HDL propose that apoAI might adopt different conformational states, one of the problems found to explain this phenomenon has been the lack of detailed structural information on apoAI associated to lipid, situation even more critical with apoCI, apoAII, and apoCIII. The study of lipid-free and lipid-bound apolipoproteins has been important to explain both cholesterol efflux from membranes and cholesterol transfer from low- and very low-density lipoproteins (LDL and VLDL). Lipid-bound apolipoproteins and more specifically lipid-bound apoAI is the main activator of LCAT [12]. During its activation, cholesterol uptake seems to be associated with the concomitant uptake of membrane phospholipids in order to reach the formation of nascent and discoidal HDLs. These particles are considered to be a transient species in equilibrium with the mature or spherical HDLs. During this reshaping process, while the phospholipid is arranged as a discoidal particle surrounded in its acyl-chain region by the amphipathic apoAI, LCAT is responsible to transform discoidal HDLs into spherical HDLs, as cholesterol starts to move as cholesterol ester from the surface to the core of the particle [15,16]. Although throughout the years two models for the structure of discoidal HDLs have been proposed; the "picket fence" and the "belt" models including its hairpin variant [17–19], both with their own points against and in favor, have not been able to answer yet, the key structural questions that would explain the fate of HDL circulating in plasma. In an attempt to define these structural key features that would give us the possibility to explain basic issues such as receptor recognition and lipid transfer activity carried out by exchangeable apolipoproteins, our group has attempted to address these points directly measuring molecular conformational changes of apolipoproteins at the air/water and lipid/water interfaces in order to approach the possible switching mechanisms that might explain these phenomena. This has been achieved employing Langmuir monolayers studied by Brewster angle microscopy (BAM), atomic force microscopy (AFM), grazing incidence X-ray diffraction [20–23], and surface force analysis (SFA) [24].

According to our results, apolipoproteins AI, AII, CI, and CIII independently of their differences in length and number of amphipathic  $\alpha$  turn regions, when placed as monolayers in an air/water interface, show upon lateral compression an important conformational change

detected as a wide kink at pressures ( $\pi$ ) between 3 and 35 mN/m, and areas ( $a$ ) between  $\sim 1000$  and  $2500 \text{ \AA}^2$ /molecule [20,21]. This change can be followed by Brewster angle microscopy and grazing incidence synchrotron X-ray diffraction measurements [22]. However, if we take into account the structural differences between the apolipoproteins such as the length and number of amphipathic  $\alpha$  turn regions in relationship with their monomeric or dimeric states, it becomes interesting to analyze the outcome of these experiments, that in general point out to the fact that all exchangeable apolipoproteins studied confine their main body to the interface (Fig. 1A). Nevertheless, there is evidence that an  $\alpha$ -helix segment gets tilted towards the hydrophobic air secondary to changes in protein lateral pressure (Fig. 1B). Our recent data have unearthed a further interesting property of binary Langmuir monolayers composed of DPPC/apos (*rac*-1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine/apolipoproteins) at the air/water interface, showing that apoCI and AII when injected into the subphase move and penetrate to the lipid/air interface (Fig. 1C) [23]. Upon lateral compression, both systems present wide kinks in an independent way, first as a transition exclusively associated to the phospholipid monolayer at  $\pi \sim 8$ – $11$  mN/m and  $a \sim 110$ – $125 \text{ \AA}^2$ /molecule, and second as a transition at  $\pi \sim 33$  mN/m and  $a \sim 350$ – $600 \text{ \AA}^2$ /molecule for apoCI, and  $\pi \sim 30$ – $35$  mN/m and  $a \sim 1000$ – $2500 \text{ \AA}^2$ /molecule for apoAII [23]. These experiments carried out in conjunction with BAM analysis put forward the fact that specific  $\alpha$ -helix segments in both apolipoproteins changed the structure and penetrated the DPPC monolayer (Fig. 1D).

Our working hypothesis becomes relevant when we extrapolate this type of conformational change to the surface of a lipoprotein [25]. In such a case, due to the small size and rich protein composition of nascent lipid-poor apoAI particles and discoidal HDLs (pre  $\beta$ -2HDL), it could be proposed that lateral pressure in the phospholipid monolayer of these particles embedded with the different apolipoproteins (apoAI, AII, CI, and E) and accessory proteins (LCAT, CETP, and PLTP) could be relatively high, and only gets decreased in parallel to changes in the size and form of these lipoproteins when they start to accumulate cholesterol esters and become spheroidal HDLs ( $\alpha$ -HDL).

Theoretical calculations employed to investigate changes in size and form of nascent, discoidal, and spheroidal or mature HDLs showing the area values obtained from the projected shadow of the different  $\alpha$ -helix components of apolipoproteins at the surface of these HDL particles have permitted us to postulate, as experimentally presented in air/water and lipid/water interfaces, that the lateral pressure of phospholipid monolayers embedded with proteins at the surface of the different HDL particles might be very different depending on their size and form [25]. We believe this

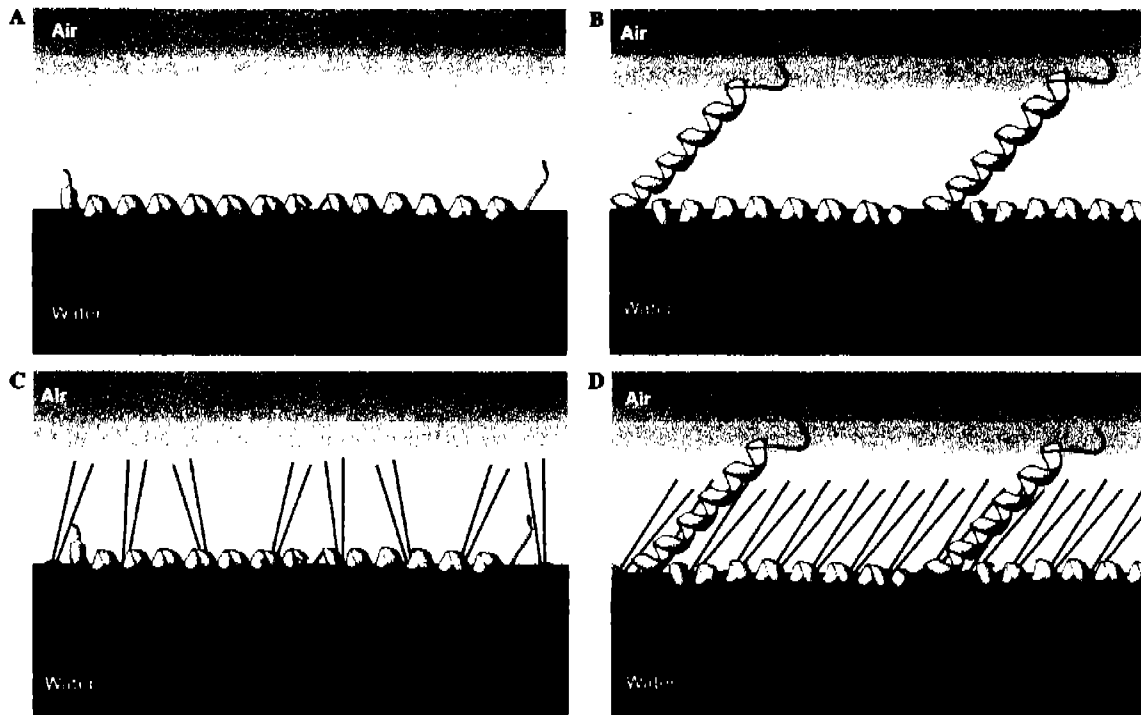


Fig. 1. Langmuir monolayers of apolipoprotein CI at the air/water interface submitted to different lateral pressures illustrating our working hypothesis. Langmuir monolayers of apoCI at the air/water interface under low (A) and high (B) lateral pressures. Binary Langmuir monolayers of DPPC/apoCI at the air/water interface at low (C) and high (D) lateral pressures [20,22,23,25].

phenomenon might define the conformation of apolipoproteins and therefore their specific function, in order to direct the fate of HDL particles in plasma.

Coming from the fact that nascent HDL particles become organized around apoAI, nowadays very little is known about the actual structural characteristics that define the behavior of apoAI under these conditions and therefore the way discoidal HDL particles start to get organized. A structural change probably related to an unfolding process of apoAI that might be important during the formation of a discoidal HDL particle remains to be investigated. Here, the possibility of a molten globule state has to be also considered, since there are examples of proteins that partially unfold near a membrane surface and are therefore proposed as a prerequisite to lipid binding [26,27]. Thermal unfolding studies of lipid-free apoAI support this proposal [28].

At this stage, let us consider an already formed discoidal HDL particle as a cylinder composed of a bilayer of phospholipids with an average diameter of 75 Å by 30 Å height, where the available lateral area calculated corresponds to 7068.5 Å<sup>2</sup>. Taking into account the base and lid surfaces of this cylinder, the average total area increases to 15904.3 Å<sup>2</sup>. Nevertheless, since apoAI has been postulated in discoidal particles to correspond to a double belt-like orientation, and if we consider apoAI as a molecule 319.5 Å<sup>2</sup> long by 5 Å wide, the projected area of two apoAI molecules upon the lateral mostly

hydrophobic area of discoidal HDLs would only cover 3195 Å<sup>2</sup>. Therefore, this calculation supports the fact that the cylinder must be distorted closer to a pill-like shape rather than a perfect cylinder in order to avoid the exposure of acyl chain of phospholipids to the hydrophilic environment. In this model, the pseudo-base and lid surfaces would give us a free area that might be occupied by other exchangeable apolipoproteins together with CETP, PLTP, and LCAT in a rather confined way.

When this HDL particle continues to grow from a discoidal shape to a spheroidal one reaching an average diameter of 12 nm, the available surface area increases to 45239 Å<sup>2</sup>, roughly an area three times larger than that shown as a discoidal particle. Therefore, depending on the number of apolipoprotein copies associated to these mature particles, but considering that the protein to lipid ratio increases at the expense of lipid incorporation to these particles, we could assume first; that lateral pressure between apolipoproteins at their surface might have considerably changed, allowing a more efficient exposure of specific apolipoprotein  $\alpha$ -regions at the surface of the lipoprotein, and second; that apolipoproteins such as apoAI now placed at the surface of spheroidal particles might have acquired a preferred rotational orientation in relationship with the phospholipid molecules [29]. This last possibility is supported by the proposal that apoAI adjusts its intermolecular interactions when

the particle changes from a discoidal to a spherical shape [19]. Further experimentation involving surface tension measurements of artificial lipoproteins showing different sizes and different contents of apolipoproteins will certainly put our hypothesis to test.

### Acknowledgments

Work in the authors' laboratories is supported by CONACYT (Grants 3855IN to J.M.-O. and 36680E to R.C.) and DGAPA-UNAM (Grants IN230303 to J.M.-O. and IN113601 to R.C.). We thank Blanca Delgado-Coello and Ma. Elena Gutiérrez for technical and word-processing help.

### References

- [1] J.C. Fielding, P.E. Fielding, Molecular physiology of reverse cholesterol transport, *J. Lipid Res.* 36 (1995) 211–228.
- [2] J.P. Despres, I. Lemieux, G.R. Dagenais, B. Cantin, B. Lamarche, HDL-cholesterol as a marker of coronary heart disease risk: the Quebec cardiovascular study, *Atherosclerosis* 153 (2000) 263–272.
- [3] O. Stein, Y. Stein, Atheroprotective mechanisms of HDL, *Atherosclerosis* 144 (1999) 285–301.
- [4] J. Plutzky, Emerging concepts in metabolic abnormalities associated with coronary artery disease, *Curr. Opin. Cardiol.* 15 (2000) 416–421.
- [5] S. Yokoyama, Apolipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux, *Biochim. Biophys. Acta* 1392 (1998) 1–15.
- [6] J.L. Breslow, Mouse models of atherosclerosis, *Science* 272 (1996) 685–688.
- [7] C.G. Brouillette, G.M. Anantharamaiah, J.A. Engler, D.W. Borhani, Structural models of human apolipoprotein A-I: a critical analysis and review, *Biochim. Biophys. Acta* 1531 (2001) 4–46.
- [8] V. Koppaka, Structural studies of discoidal lipoprotein A-I, *Cell. Mol. Life Sci.* 58 (2001) 885–893.
- [9] M.S. Kumar, M. Carson, M.M. Hussain, H.M. Murthy, Structures of apolipoprotein A-II and a lipid-surrogate complex provide insights into apolipoprotein–lipid interactions, *Biochemistry* 41 (2002) 11681–11691.
- [10] S. Acton, A. Rigotti, K.T. Landschulz, S. Xu, H.H. Hobbs, M. Krieger, Identification of scavenger receptor SR-B1 as a high density lipoprotein receptor, *Science* 271 (1996) 518–520.
- [11] J.A. Kuivenhoven, G.K. Hovingh, A. van Tol, M. Jauhiainen, C. Ehnholm, J.C. Fruchart, E.A. Brinton, J.D. Otvos, A.H. Smell, A. Brownlee, A.H. Zwinderman, M.R. Hayden, J.J. Kastelein, Heterozygosity for ABCA1 gene mutations: effects on enzymes, apolipoproteins and lipoprotein particle size, *Atherosclerosis* 171 (2003) 311–319.
- [12] M.G. Sorci-Thomas, L. Curtiss, J.S. Parks, M.J. Thomas, M.W. Kearns, M. Landrum, The hydrophobic face orientation of apolipoprotein A-I amphipathic helix domain 143–164 regulates lecithin: cholesterol acyltransferase activation, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 11776–11782.
- [13] B.F. Azztalos, K.V. Horvath, K. Kajinami, C. Nartsupha, C.E. Cox, M. Batista, E.J. Shaefer, A. Inazu, H. Mabuchi, Apolipoprotein composition of HDL in cholesteryl ester transfer protein deficiency, *J. Lipid Res.* 45 (2004) 448–455.
- [14] J.F. Oram, W. Wolfbauer, A.M. Vaughan, C. Tang, J.J. Albers, Phospholipid transfer protein interacts with and stabilizes ATP-binding cassette transporter AI and enhances cholesterol efflux from cells, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 52379–52385.
- [15] G. Wang, How the lipid-free structure of the N-terminal truncated human apoA-I converts to the lipid-bound form: new insights from NMR and X-ray structural comparison, *FEBS Lett.* 529 (2002) 157–161.
- [16] M.A. Clay, D.A. Cehic, D.H. Pyle, K.A. Rye, P.J. Barter, Formation of apolipoprotein-specific high-density lipoprotein particles from lipid-free apolipoproteins A-I and A-II, *Biochem. J.* 337 (1999) 445–451.
- [17] V. Narayanaswami, J.N. Maiorano, P. Dhanasekaran, R.O. Ryan, M.C. Phillips, S. Lund-Katz, W.S. Davidson, Helix orientation of the functional domains in apolipoprotein E in discoidal high density lipoprotein particles, *J. Biol. Chem.* 79 (2004) 14273–14279.
- [18] A.E. Klon, J.P. Segrest, S.C. Harvey, Comparative models for human apolipoprotein A-I bound to lipid in discoidal high-density lipoprotein particles, *Biochemistry* 41 (2002) 10895–10905.
- [19] D.P. Rogers, L.M. Roberts, J. Lebowitz, G. Datta, G.M. Anantharamaiah, J.A. Engler, C.G. Brouillette, The lipid-free structure of apolipoprotein A-I: effects of amino-terminal deletions, *Biochemistry* 37 (1998) 11714–11725.
- [20] V.M. Bolaños-García, J. Mas-Oliva, S. Ramos, R. Castillo, Phase transitions in monolayers of human apolipoprotein C-I, *J. Phys. Chem. B* 103 (1999) 6236–6242.
- [21] V. Bolaños-García, S. Ramos, J. Xicohtencatl-Cortés, R. Castillo, J. Mas-Oliva, Monolayers of apolipoproteins at the air/water interface, *J. Phys. Chem. B* 105 (2001) 5757–5765.
- [22] J. Rufz-García, A. Moreno, G. Brezesinaki, H. Mõhwald, J. Mas-Oliva, R. Castillo, Phase transitions and conformational changes in monolayers of human apolipoproteins CI and AII, *J. Phys. Chem. B* 107 (2003) 11117–11124.
- [23] J. Xicohtencatl-Cortés, J. Mas-Oliva, R. Castillo, Phase transitions of phospholipid monolayers penetrated by apolipoproteins, *J. Phys. Chem. B* 108 (2004) 7307–7315.
- [24] J. Campos-Terán et al., Interaction and conformations of  $\alpha$ -helical human apolipoprotein CI on hydrophobic and hydrophilic substrates (2004) submitted.
- [25] J. Mas-Oliva, A. Moreno, S. Ramos, J. Xicohtencatl-Cortés, J. Campos, R. Castillo, Monolayers of apolipoprotein AII at the air/water interface, in: N.S. Dhalla, et al. (Eds.), *Frontiers in Cardiovascular Health*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2003, pp. 341–352.
- [26] A.K. Lala, P. Kaul, P.B. Ratnam, Membrane-protein interaction and the molten globule state: interaction of alpha-lactalbumin with membranes, *J. Protein Chem.* 14 (1995) 601–609.
- [27] S. Banuelos, A. Muga, Binding of molten globule-like conformations to lipid bilayers. Structure of native and partially folded alpha-lactalbumin bound to model membranes, *J. Biol. Chem.* 170 (1995) 29910–29915.
- [28] O. Gursky, D. Atkinson, Thermal unfolding of human high-density apolipoprotein A-I: implications for a lipid free molten globular state, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 2991–2995.
- [29] A.E. Klon, J.P. Segrest, S.C. Harvey, Molecular dynamics simulations on discoidal HDL particles suggest a mechanism for rotation in the Apo A-I belt model, *J. Mol. Biol.* 324 (2002) 703–721.