



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Correlación Estructura/Función
de Apolipoproteínas Plasmáticas

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

PAOLA MENDOZA ESPINOSA



MÉXICO, DF, 2007.



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.

Jurado asignado:

| | |
|----------------------------|--|
| Presidente | Prof. Jorge Manuel Vázquez Ramos |
| Vocal | Prof. Rosario Adelaida Muñoz Clares |
| Secretario | Prof. Jaime Mas Oliva |
| 1 ^{er} . Suplente | Prof. Lucia Hernández Garcíadiago |
| 2 ^{do} .Suplente | Prof. Francisco Javier Plasencia de la Parra |

Sitio en donde se realizó el tema:
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

Tutor
Dr. Jaime Mas Oliva

Sustentante
Mendoza Espinosa Paola



AGRADECIMIENTOS

A Dios por la vida y la familia con la que me bendijo.....

A mi mamá Olga Espinosa por todo el amor que siempre me ha brindado y la fuerza que me inyecta día a día para alcanzar todos mis propósitos. A mi papá José Luis Mendoza por enseñarme a que los sueños se pueden alcanzar si se lucha lo suficiente por ellos. A mis hermanos Olga, José Luis y Adolfo porque han hecho de este viaje una increíble aventura y son la alegría de mi vida, los quiero mucho.

A mi tía Mica, mi tío Neph y mis primos Erika, Sandra, Marco y Karim porque su amor incondicional me ayudó en los momentos más difíciles de mi vida.

A Laura y Natalia por su amistad y su apoyo en las buenas y en las malas.

A mis compañeros del laboratorio Salvador y Ernesto porque siempre tienen la solución a mis problemas existenciales, gracias chicos. A Malena Gutiérrez por todo su apoyo y amistad. A Blanca Delgado por su apoyo técnico y colaboración en el laboratorio.

Al Dr. Juan Pablo Reyes Grajeda, por su asesoría, apoyo técnico y académico para el desarrollo de este trabajo.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Jaime Mas Oliva, que fue tutor para el desarrollo de este trabajo científico y por darme la oportunidad en su laboratorio de iniciarme en este camino. Gracias por su confianza.



| ÍNDICE | Pág. |
|---|-------------|
| 1. Resumen..... | 1 |
| 2. Introducción..... | 3 |
| 3. Objetivos..... | 7 |
| Objetivo general..... | 7 |
| Objetivos específicos..... | 7 |
| 4. Hipótesis..... | 8 |
| 5. Material y métodos..... | 9 |
| Materiales..... | 9 |
| Síntesis de péptidos..... | 9 |
| Estimación del contenido de estructura secundaria por medio de Dicroísmo Circular (DC)..... | 10 |
| Cálculo del porcentaje de hélice α | 11 |
| Cálculo de momento hidrofóbico y giros helicoidales de ALDO, ARELI y SAK..... | 11 |
| Reconstitución de los péptidos ALDO, ARELI y SAK..... | 12 |
| Ensayo de cambio estructural de ALDO, ARELI y SAK en presencia de Trifluoroetanol (TFE) y Dodecil sulfato de sodio (SDS)..... | 12 |
| Ensayo de cambio estructural de ALDO, ARELI y SAK con 1,2-Dihexanoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DHPC), 1-Lauril-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (Liso C ₁₂ PC) y 1-Hexanoil-2-Hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (Liso C ₆ PC) en ausencia y presencia de colesterol..... | 13 |
| Ensayo de cambio estructural de ALDO, ARELI y SAK con liposomas de L- α -Fosfatidilcolina (PC) en ausencia y presencia de colesterol | 14 |
| 6. Resultados y Discusión..... | 16 |
| 7. Conclusiones y Perspectivas..... | 30 |
| 8. Apéndice..... | 31 |
| 9. Bibliografía..... | 50 |



| ÍNDICE DE FIGURAS | | Pág. |
|--------------------------|--|-------------|
| Fig. 1 | Predicción de estructura secundaria de ApoCl..... | 4 |
| Fig. 2 | Estructura por RMN de ApoCl, se muestran los dos segmentos estructurados en hélice α | 5 |
| Fig. 3 | Estructura por RMN de ApoCl y secuencia de ApoCl..... | 9 |
| Fig. 4 | Espectros de dicroísmo circular mostrando las diferentes conformaciones de una proteína..... | 10 |
| Fig. 5 | Proyección de giros helicoidales de los segmentos de la apo Cl en estudio ALDO(7-24) , ARELI (22-38) y SAK (35-53)..... | 16 |
| Fig. 6 | Estimación del contenido de estructura secundaria de ALDO, ARELI y SAK en agua a una concentración de 200 μ g/ml | 19 |
| Fig. 7 | Estimación del contenido de estructura secundaria hélice α de ALDO, ARELI y SAK en 80% TFE | 20 |
| Fig. 8 | Estimación del contenido de estructura secundaria hélice α de ALDO, ARELI y SAK en SDS 20mM..... | 21 |
| Fig. 9 | Estimación del contenido de estructura secundaria hélice α de ALDO, ARELI y SAK en Liso-C ₁₂ PC | 22 |
| Fig. 10 | Estimación del contenido de estructura secundaria hélice α de ALDO, ARELI y SAK en PC 50 μ M..... | 23 |
| Fig. 11 | Estimación del contenido de estructura secundaria hélice α de ALDO, ARELI y SAK en PC 50 μ M más Colesterol..... | 25 |
| Fig. 12 | Estimación del contenido de estructura secundaria hélice α de ALDO, ARELI y SAK en DHPC 14mM | 26 |
| Fig. 13 | Estimación del contenido de estructura secundaria hélice α de ALDO, ARELI y SAK en DHPC 14mM más Colesterol..... | 26 |
| Fig. 14 | Estimación del contenido de estructura secundaria hélice α de ALDO, ARELI y SAK en Liso-C ₆ PC 20mM | 27 |
| Fig. 15 | Estimación del contenido de estructura secundaria hélice α de ALDO, ARELI y SAK en Liso-C ₆ PC 20mM más Colesterol | 27 |



ÍNDICE DE TABLAS

| | Pág. |
|--|-------------|
| Tabla 1. Estructura química de los fosfolípidos, colesterol, SDS y TFE..... | 15 |
| Tabla 2. Propiedades químicas y físicas de los péptidos..... | 17 |
| Tabla 3. Efecto de diferentes familias de lípidos en la estructura secundaria de péptidos derivados de apo Cl..... | 28 |



ABREVIATURAS

| | |
|----------------------------------|--|
| δ | ángulo expresado en radianes |
| $[\theta_{\text{experimental}}]$ | elipticidad observada |
| θ_{222} | elipticidad molar promedio a 222 nm |
| μH | momento hidrofóbico |
| ApoCI | apolipoproteína CI |
| C | concentración |
| CETP | proteína transferidora de ésteres de colesterol (cholesterol ester transfer protein) |
| CMC | concentración micelar crítica |
| Da | daltones |
| DC | dicroísmo circular |
| DHPC | 1-2-dihexanoil-sn-glicero-3-fosfocolina |
| DMPC | 1,2-dimiristoil fosfatidilcolina |
| HDL | lipoproteína de alta densidad (high density lipoprotein) |
| H_n | hidrofobicidad por residuo de aminoácido |
| IDL | lipoproteína de densidad intermedia (intermedia density lipoprotein) |
| KDa | kilodaltones |
| LCAT | lecitin-colesterol aciltransferasa (lecithin-cholesterol acyltransferase) |
| LDL | lipoproteína de baja densidad (low density lipoprotein) |
| LH | lipasa hepática |
| Liso-C ₆ PC | 1-hexanoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina |
| Liso-C ₁₂ PC | 1-lauril-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina |
| LPL | lipasa lipoprotéica (lipoprotein lipase) |
| LRP | proteína relacionada con el receptor de LDL (LDL receptor-related protein) |
| M | molar |
| mg | miligramos |
| ml | mililitros |
| mM | milimolar |



| | |
|-------|---|
| MRC | concentración media por residuo (molecular residue concentration) |
| N | número total de aminoácidos del segmento peptídico |
| n | enésimo residuo |
| nm | nanómetro |
| RMN | resonancia magnética nuclear |
| PC | L- α -fosfatidilcolina |
| PI | punto isoelectrico |
| PLTP | proteína transferidora de fosfolípidos (plasma phospholipid transfer protein) |
| PM | peso molecular |
| SDS | dodecil sulfato de sodio |
| SR-B1 | receptor pepenador (scavenger receptor class B type 1) |
| TRC | transporte reverso del colesterol |
| TFE | 2,2,2-trifluoroetanol |
| UV | luz ultravioleta |
| VLDL | lipoproteína de muy baja densidad (very low density lipoprotein) |



1.RESUMEN

El presente estudio está encaminado en conocer los mecanismos que promueven los cambios estructurales en la apolipoproteína CI, secundarios a su unión a lípidos. Como una estrategia metodológica se decidió subdividir esta proteína en tres péptidos, que corresponden a su parte amino, media y carboxilo, los cuales se nombraron en función de los primeros aminoácidos que los componen como ALDO, ARELI y SAK respectivamente. Estos péptidos se estudiaron por dicroísmo circular (DC) en diferentes ambientes lipídicos. Observamos que estos péptidos son solubles en agua y no presentan estructura secundaria definida a diferencia de la apoCI completa, que en este mismo medio presenta un alto contenido de estructura hélice α . Sin embargo, se observó que los péptidos ALDO y en mayor proporción SAK presentan un cambio conformacional a hélice α en presencia del lisofosfolípido Liso-C₁₂PC por arriba de su concentración micelar crítica (CMC). Por otro lado, el fosfolípido dihexanoil fosfatidilcolina en concentraciones cercanas a su CMC, induce sólo en el péptido SAK el mismo tipo de cambio conformacional. Estos cambios conformacionales observados en los segmentos peptídicos, refuerzan resultados de estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo con la apolipoproteína CI en monocapas de Langmuir. Estos experimentos previos en conjunto con los resultados de este trabajo, nos muestran la posibilidad de que la apolipoproteína CI asociada a la superficie de partículas lipoprotéicas de alta densidad, presente cambios conformacionales dependientes de la forma de la partícula, así como de los lípidos que lo constituyen. Nuestros experimentos muestran que el lisofosfolípido Liso-C₁₂PC induce en los péptidos ALDO, ARELI y SAK, un cambio en su estructura secundaria, que va de una forma desestructurada a la



formación de hélice α . Esto nos permite concluir que la interacción fosfolípido-péptido involucra de forma importante el grupo glicerofosforilcolina en la interfase hidrofílica/hidrofóbica de los agregados micelares estudiados y que las cadenas hidrocarbonadas más que inducir estabilizan la conformación hélice α por medio de los aminoácidos aromáticos que contienen.



2. INTRODUCCIÓN

El colesterol, sus ésteres, los fosfolípidos y triglicéridos son altamente insolubles en agua, por lo que son transportados en el torrente circulatorio mediante lipoproteínas plasmáticas. Estas partículas son complejos macromoleculares que consisten de un centro hidrofóbico de ésteres de colesterol y/o triglicéridos rodeado por una monocapa superficial de colesterol, fosfolípidos y proteínas específicas llamadas apolipoproteínas (apos). Diferentes combinaciones de lípidos y proteínas dan lugar a partículas lipoprotéicas de diferentes densidades en el plasma, las cuales fueron denominadas quilomicrones, y por sus siglas en inglés VLDL (very low density lipoprotein), IDL (intermediate density lipoprotein), LDL (low density lipoprotein) y HDL (high density lipoprotein), siendo estas últimas las lipoproteínas de mayor densidad (Dolphin 1984).

Las apolipoproteínas tienen la característica de ser proteínas anfipáticas con la capacidad de permanecer en una interfase polar/no polar, adoptando principalmente una estructura secundaria de tipo hélice α y orientando sus regiones hidrofílicas e hidrofóbicas de acuerdo a las características de esta interfase (Bolaños et al. 2001). Esta orientación de las apolipoproteínas estabiliza a las partículas lipoprotéicas y permite la interacción con sus receptores localizados en la superficie de ciertos tipos celulares (Xicohtencatl et al. 2004). Algunas de las apolipoproteínas además tienen la capacidad de intercambiarse entre los diferentes tipos de lipoproteínas, por lo que se clasifican como apolipoproteínas intercambiables y no intercambiables. El primer grupo incluye a la apo AI, AII, AIV, CI, CII, CIII y E, las cuales pueden unirse a diferentes tipos de lipoproteínas; el segundo grupo incluye a la apo B48 y apo B100, estas proteínas se encuentran fijadas a un tipo en particular de lipoproteína. De los diferentes tipos de lipoproteínas, las HDL son de especial interés en el área biomédica debido a que están involucradas en el transporte reverso de colesterol (TRC) (Sviridov et al. 2007), un proceso mediante el cual es removido el exceso de colesterol de las membranas celulares, por lo que se ha propuesto como un mecanismo de protección contra la arterosclerosis (Breslow 1996; Stein y Stein 1999; Despres et al. 2000; Plutzky 2000). Asociadas a la HDL se encuentran diferentes apolipoproteínas dentro de las que destaca la Apo AI que representa el 70% de la fracción proteica. Otras proteínas que se encuentran asociadas a la HDL son la ApoCI, CII, CIII, AI, AII y E.



Apolipoproteína CI

La apolipoproteína CI (ApoCI) se encuentra principalmente en la VLDL y en menor proporción en la HDL. Activa la esterificación de colesterol por la vía de la lecitín colesterol acil transferasa (LCAT) (Albers et al. 1979; Jonas et al. 1990) y estimula el crecimiento celular (Tournier et al. 1984). Disminuye la unión de IDL y de VLDL al receptor de LDL mediada por la apolipoproteína E (Sehayek y Eisenberg 1991) y la unión de VLDL al receptor LRP (Proteína Relacionada con el receptor de LDL) (Weisgraber et al. 1990; Swaney y Weisgraber 1994). Tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad de la lipasa lipoprotéica (LPL) (Brown et al. 1972) y la lipasa hepática (LH) (Kinnunen y Ehnolm 1976). La ApoCI es el mayor inhibidor plasmático de la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP). La ApoCI es una proteína de una sola cadena, posee 57 aminoácidos y tiene un peso molecular de 6.63 KDa. Para determinar de manera teórica su estructura secundaria se han empleado diferentes programas, como el programa de predicción de estructura secundaria Network Protein Sequence Analysis (Fig.1). Sin embargo, ya se conoce la estructura tridimensional de ApoCI definida mediante RMN en presencia de micelas de SDS (Rozek et al. 1999) (Fig2). La estructura por RMN de ésta proteína muestra que tiene dos hélices denominadas $\alpha 1$ y $\alpha 2$ ubicadas en los residuos 7-29 y 38-52, con una longitud de 28.5Å y 40.5Å respectivamente y unidas por un segmento de estructura secundaria al azar, que se encuentra en los residuos 30-37 (Campos et al. 2004). La falta de estructura secundaria definida entre las dos hélices podría ser el resultado de una falta de periodicidad de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos requeridos para la formación de una hélice anfipática (Segrest et al. 1992) (Fig.1).

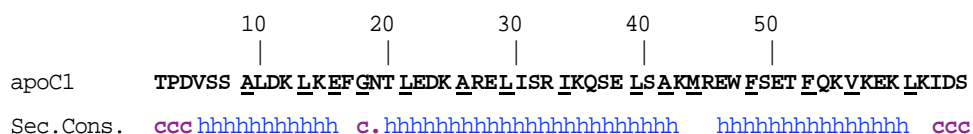


Fig 1. Predicción de estructura secundaria de ApoCI. h=hélice, c=beta, •=estructura secundaria no definida. La letra subrayada indica que es un aminoácido hidrofóbico.

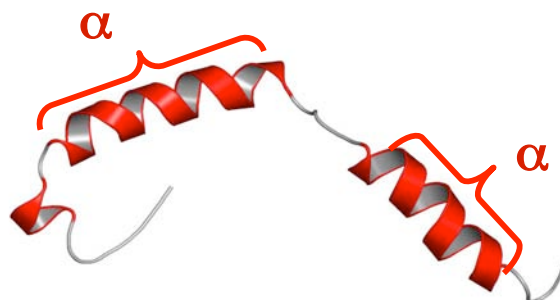


Fig 2. Estructura por RMN de ApoCI, se muestran los dos segmentos estructurados en hélice α .

Se ha observado por medio de experimentos de Dicroísmo Circular (DC) que la ApoCI en presencia de fosfolípidos adquiere un alto porcentaje de estructura hélice α , lo cual es muy importante para explicar los procesos que realiza esta apolipoproteína (Morrisett et al. 1976). Las dos hélices α que conforman a la ApoCI son del tipo anfipático y se ha reportado en la literatura que este tipo de estructuras juegan un papel muy importante en el remodelamiento de las lipoproteínas (Gursky y Atkinson 1996; Bolaños et al. 1997; Fang et al. 2003a; 2003b). En la literatura existen descritas principalmente 7 tipos de hélices α anfipáticas de acuerdo a sus propiedades estructurales y fisicoquímicas: A, H, L, K, G, C, M (Segrest y col. 1990,1992). Las dos hélices α que conforman a la ApoCI pertenecen a la clase de hélices anfipáticas tipo A_2 , que incluye hélices con residuos aminoácidos positivamente cargados localizados en la interface polar–no polar y los residuos de aminoácidos negativamente cargados son localizados en el centro de la face polar. Nuestro grupo de trabajo ha propuesto una nueva clase de hélice anfipática denominada "M-like", encontrada en la región carboxilo terminal (454-476) de la CETP. 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 colaboradores. En trabajos recientes realizados por el grupo del Dr. Mas, se ha estudiado el comportamiento fisicoquímico de varias apolipoproteínas (CI, CIII, AI y AII) en monocapas de Langmuir sometidas a diferentes presiones laterales en ausencia y en presencia de lípido.



Las monocapas de Langmuir son películas de una molécula de espesor localizadas en una interfase aire/agua o lípido/agua. Para su formación se usan 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). Se realizaron isothermas presión superficial-área por molécula (p-A) para cada una de las apolipoproteínas y al analizar éstas se observó que la correspondiente a la ApoCI presenta un especial punto de inflexión, el cual fue asociado al desprendimiento de la interfase de una de las dos hélices α que la componen.

Esto ha sido corroborado mediante técnicas de microscopía de ángulo de Brewster y difracción de rayos-X de ángulo rasante (Bolaños et al. 1999,2001; Ruíz et al. 2003; Xicohtencatl et al. 2004; Campos et al. 2004). Probablemente la ApoCI utilizó a manera de “bisagra” el segmento desestructurado que tiene entre las hélices α_1 y α_2 . Este cambio en la estructura de la ApoCI sobre una monocapa de fosfolípidos en respuesta a presión lateral, pudiera extrapolarse al fenómeno que ocurre en la superficie de las HDL nacientes, cuando pasan de una forma discoidal y tamaño pequeño (pre α -2HDL) a una forma esférica y de mayor tamaño (α -HDL). Las pre α -2HDL tienen un alto contenido de proteína en su superficie (ApoAI, AII, CI, y E) así como proteínas accesorias: proteína transferidora de lípidos (PLTP), CETP y LCAT, por lo cual se ha propuesto que la partícula pre α -2HDL tiene una presión lateral alta en su superficie, la cual sólo disminuye cuando aumenta su tamaño y cambia a una forma esférica (α -HDL). Esto último debido a la internalización de lípidos por la acción de la enzima LCAT, que esterifica el colesterol de la superficie de esta lipoproteína e induce su desplazamiento al núcleo de la partícula. Diferentes factores, entre ellos el cambio de forma y tamaño de la HDL durante su tránsito por el plasma, podrían inducir en segmentos de la ApoCI cambios conformacionales que pudieran regular la función enzimática y de transporte de lípidos que lleva a cabo la partícula.



3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

- Estudiar los cambios conformacionales en una serie de péptidos derivados de la apolipoproteína CI, en presencia de lisofosfolípidos y fosfolípidos con la finalidad de conocer los aspectos estructurales de la apolipoproteína CI en complejo con la lipoproteína de alta densidad.

3.2 Objetivos Específicos

- Diseño de segmentos peptídicos derivados de la ApoCI.
- Caracterización de la estructura secundaria de estos péptidos por dicroísmo circular.
- Definir cambios específicos de estructura secundaria de estos péptidos en presencia de diferentes moléculas.



4.HIPÓTESIS

La inducción de cambios a nivel de estructura secundaria de péptidos derivados de la ApoC1 llevados a cabo por moléculas lipídicas específicas está directamente asociada con los procesos fisiológicos de la proteína completa sobre la HDL.



5. MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

L- α -Fosfatidilcolina (PC), 1,2-Dihexanoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DHPC), 1-Lauril-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (Liso-C₁₂PC), 1-Hexanoil-2-Hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (Liso-C₆PC) se adquirieron con Avanti Lipids, Colesterol con pureza de 99% de SIGMA, Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) de SIGMA y 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) de MP Biomedicals.

Síntesis de péptidos

Se sintetizaron tres péptidos derivados de la secuencia de ApoCI (PeptidoGenic Research & Co. Livermore, USA), con base en su valor de momento hidrofóbico y los segmentos en los que se puede subdividir a esta proteína conforme a su estructura secundaria: el segmento amino terminal, la región media o bisagra y el segmento carboxilo terminal. El primer segmento peptídico incluye a los residuos del 7 al 24, el segundo del 22 al 38 y el tercero del 35 al 53, denominados ALDO, ARELI y SAK respectivamente en función de las primeras letras de los aminoácidos que componen su estructura primaria (Fig.3).

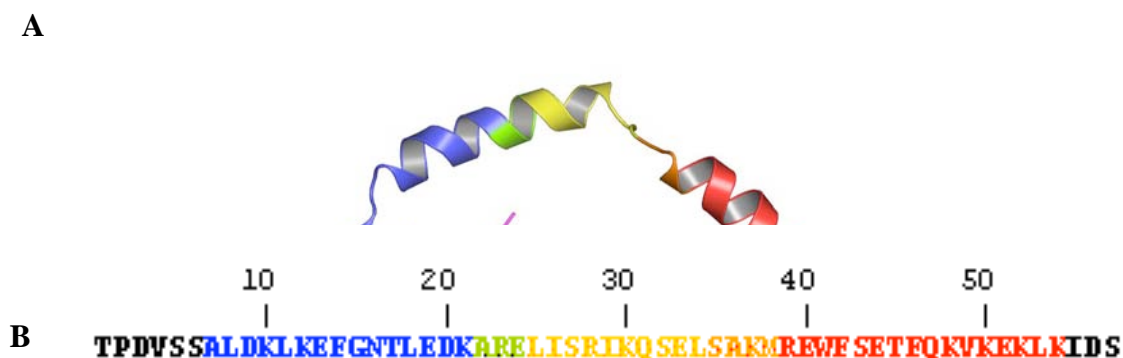


Fig 3. A) Estructura por RMN de ApoCI. B) Secuencia de ApoCI, los segmentos peptídicos en estudio están diferenciados por color: ALDO (7-24) ●, ARELI (22-38) ● y SAK (35-53) ●. Los aminoácidos traslapados se muestran en diferente color.

Estimación del contenido de estructura secundaria por medio de Dicroísmo

Circular



El DC es una de las técnicas espectropolarimétricas más utilizadas para estimar el porcentaje de estructura secundaria de proteínas en solución (Johnson 1996; Woody 1996). El espectro de DC de proteínas en la región del UV lejano (debajo de 240-250 nm) es extremadamente sensible a los diferentes tipos de estructura secundaria que se encuentran en las proteínas (Curtis 1990; Greenfield 1996). En la (fig.4) se observan los espectros característicos de DC para los diferentes tipos de estructuras secundarias. A los péptidos ALDO, ARELI y SAK en solución se les estimó el porcentaje de estructura secundaria mediante DC. Los espectros de dicroísmo circular se registraron en un espectropolarímetro Aviv 62DS utilizando celdas de cuarzo de 0.1 cm de longitud usando un tiempo de integración de 2.5 segundos cada 0.5 nm y a lo largo de la región 250-190 nm del espectro electromagnético a 25°C.

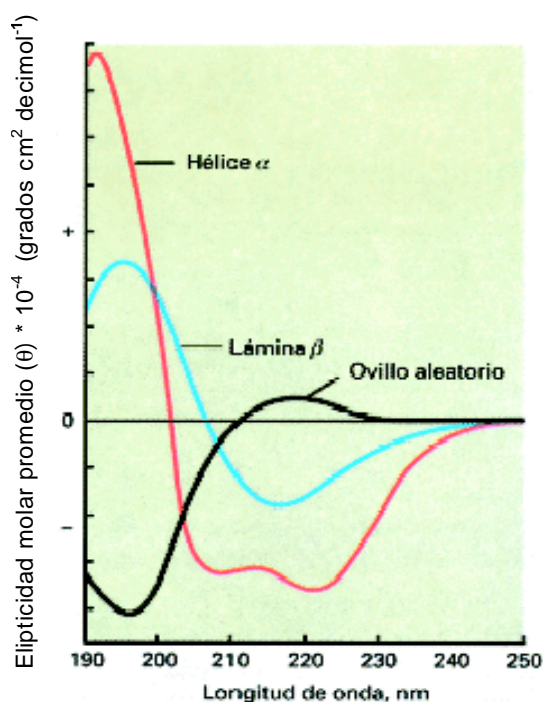


Fig. 4. Espectros característicos de dicroísmo circular mostrando los diferentes tipos de estructura secundaria de una proteína.

El contenido de hélice α para cada apolipoproteína se calculó usando el programa PROSEC 3.1 (Aviv Associates Inc., NJ). Los datos se reportan como elipticidad molar promedio por residuo y en unidades de grado por centímetro cuadrado por decimol.



La concentración molar por residuo [MRC] se calculó con base en la ecuación 1:

$$[\text{MRC}] = \frac{[\text{Concentración en mg/ml}][\text{número de aminoácidos}]}{[\text{Peso molecular}][\text{número de cadena}]} \dots\dots\dots (1)$$

La elipticidad molar promedio por residuo $[\theta]$ se calculó en base a la ecuación 2:

$$[\theta] = \frac{[\theta_{\text{experimental}}]}{[\text{MRC}][\text{Longitud de la celda}][10]} \dots\dots\dots (2)$$

Cálculo del porcentaje de hélice α

Utilizando como modelo un polipéptido de poli-L-Alanina con estructura secundaria de hélice α , se determinó la máxima elipticidad a 222 nm y se dedujo la ecuación 3 (Rozek et al. 1997):

$$\% \text{ hélice } \alpha = \frac{[\theta_{222} + 3000]}{36000 + 3000} \dots\dots\dots (3)$$

θ_{222} = Elipticidad molar promedio a 222 nm

Cálculo de momento hidrofóbico y giros helicoidales de ALDO, ARELI y SAK

Las representaciones helicoidales “Helical Wheel” de los péptidos ALDO, ARELI y SAK utilizando el programa PROTEAN del DNASTAR (ver sección de resultados), nos muestran la orientación asimétrica de los residuos hidrofóbicos e hidrofílicos presentes en estos péptidos. La magnitud del momento hidrofóbico (μH) es un parámetro que nos indica la capacidad que tiene la hélice de permanecer entre una fase hidrofóbica y una hidrofílica (Eisenberg et al. 1984a y 1984b). Este parámetro se determinó para cada péptido utilizando la ecuación 4:

$$\mu H = \frac{1}{N} \sqrt{\left[\sum_{n=1}^N H_n \sin(\partial n) \right]^2 + \left[\sum_{n=1}^N H_n \cos(\partial n) \right]^2} \dots\dots\dots (4)$$



μH = valor de momento hidrofóbico

N= número total de aminoácidos del segmento peptídico

H_n = hidrofobicidad del enésimo residuo

ϑ = 100 grados de arco (radianes)

n= enésimo residuo

Los valores de H_n se obtuvieron de Eisenberg et al. 1989 y el valor de ϑ es de 100° medido en radianes, es el ángulo que existe entre las cadenas laterales de cada aminoácido en una hélice α teórica perfecta. Se ha sugerido que hélices α con valores de μH por arriba de 0.2Kcal/mol tienen una alta capacidad de formar hélices de tipo anfipáticas.

Reconstitución de los péptidos ALDO , ARELI y SAK

Se realizaron soluciones primarias con cada uno de los péptidos liofilizados a una concentración de 1 mg/ml en agua MilliQ . Para preparar las muestras de cada péptido, se tomaron alícuotas de 60 μ l de la solución primaria y se colocaron en un microtubo con la solución de moléculas a ensayar. La concentración final de péptido para todos los ensayos fue de 200 μ g/ml.

Ensayo de cambio estructural de ALDO, ARELI y SAK en presencia de Trifluoroetanol (TFE) y Dodecil sulfato de sodio (SDS)

Se ha reportado que el alcohol TFE y el detergente SDS inducen un aumento en el porcentaje de estructura secundaria de péptidos y proteínas, por lo cual se utilizaron como control positivo (Rozek et al. 1995, 1997; MacPhee C.E et al. 1997; Hirota et al. 1998; Reiersen et al. 2000). Se realizaron soluciones con cada péptido en presencia de 20, 40, 60 y 80% v/v de TFE y con SDS a 1.5, 5 y 20mM. Las muestras se incuban por 12 h a temperatura ambiente antes de caracterizarlas por DC.



Ensayo de cambio estructural de ALDO, ARELI y SAK con 1,2-Dihexanoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DHPC), 1-Lauril-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (Liso-C₁₂PC) y 1-Hexanoil-2-Hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (Liso-C₆PC) en ausencia y presencia de colesterol

El DHPC y Liso-C₁₂PC se encuentran comercialmente disueltos en cloroformo a una concentración inicial de 20mg/ml y el Liso-C₆PC a 50mg/ml. El cloroformo en el que se encuentran disueltas estas moléculas se evaporó en un equipo Speed Vac (SAVANT) y se reconstituyeron adicionando 240µl de agua MilliQ degasificada y 60µl de solución a 1mg/ml del péptido a ensayar para obtener un volumen final de 300µl. Se realizaron soluciones con cada péptido en presencia de DHPC a concentraciones de: 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5 y 14.0 mM, de Liso-C₁₂PC: 1.5, 5.0 y 20.0 mM y de Liso-C₆PC: 1.5, 5.0, 20.0 y 40.0 mM. Estas muestras se incubaron por 12 horas a temperatura ambiente antes de su caracterización por DC. Las muestras realizadas y caracterizadas por DC de DHPC: 14mM, Liso-C₁₂PC: 1.5, 5 y 20mM y Liso-C₆PC: 1.5, 5, 20 y 40mM se utilizaron para estudiar el efecto del colesterol. Se preparó una solución 1.5 M de colesterol en cloroformo y se adicionaron 2µl de esta solución a las muestras seleccionadas. Las muestras con colesterol nuevamente se incubaron 12 h a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugaron a 13000 rpm por 30 min a la misma temperatura. El sobrenadante de cada muestra se colocó en un microtubo limpio para evitar resuspender el botón de colesterol no incorporado a la solución y se caracterizó por DC.

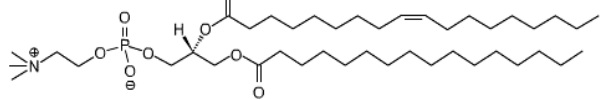
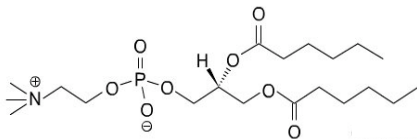
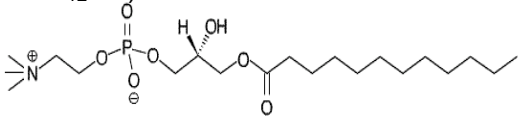
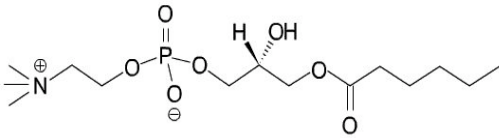
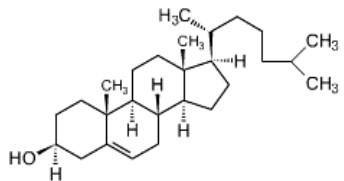
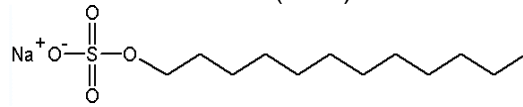
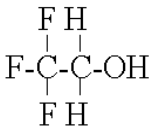


Ensayo de cambio estructural de ALDO, ARELI y SAK con liposomas de L- α -Fosfatidilcolina (PC) en ausencia y presencia de colesterol.

El fosfolípido PC se encuentra comercialmente en una solución cloroformo:metanol (9:1) en una concentración de 100mg/ml. Se prepararon dos soluciones iniciales de PC a una concentración de 1mM, una libre y otra con colesterol. Para ambas soluciones se colocó 80 μ l de PC en un vial de vidrio, a la solución de PC que además lleva colesterol se le adicionó 1 mg de esta molécula disuelta en un mínimo de cloroformo y se homogenizó. Los viales con PC y PC más colesterol se colocaron bajo un flujo de nitrógeno hasta la evaporación total del cloroformo. Posteriormente se adicionó a cada vial 10 ml de agua MilliQ desgasificada. Las soluciones de lípido se sonicaron con un equipo ultrasonicador Branson (SONIFIER 250) con pulsos de 15 segundos por 30 segundos de reposo en un tiempo total de 30 min, se utilizó una sonda de titanio de 10 mm de diámetro. Ambas soluciones se incubaron 2 h a temperatura ambiente y se centrifugaron a 13500 rpm para eliminar los residuos de titanio de la sonda (New 1990). A partir de la solución 1mM de PC sin colesterol se prepararon soluciones con cada péptido a concentraciones de 2.5, 5, 10, 25, y 50 μ M de este fosfolípido. Con la solución 1mM de PC y colesterol se prepararon muestras con cada péptido a una concentración 50 μ M de PC. Todas las muestras se incubaron por 12 h a temperatura ambiente antes de su caracterización por DC.



Tabla 1. Estructura y propiedades físicas de los fosfolípidos, lisofosfolípidos colesterol, SDS y TFE, en las concentraciones analizadas en este apartado.

| Fosfolípidos | CMC | Concentraciones utilizadas |
|--|----------------------|----------------------------|
| <p>L-α-Fosfatidilcolina (PC)</p>  | < 0.005 mM | 0.050 mM |
| <p>1,2-Dihexanoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DHPC)</p>  | 15 mM | 14 mM |
| <p>1-Lauril-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (Liso-C₁₂PC)</p>  | 0.9 mM | 20 mM |
| <p>1-Hexanoil-2-Hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (Liso 6 PC)</p>  | > 114 mM | 20 mM |
| <p>Colesterol</p>  | ----- | ----- |
| Controles positivos (moléculas que inducen estructura hélice α) | | |
| <p>Dodecil Sulfato de Sodio (SDS)</p>  | 8.5 mM | 20 mM |
| <p>2,2,2-trifluoroetanol (TFE)</p>  | | 40% v/v |



6.RESULTADOS Y DISCUSION

Los valores de momento hidrofóbico calculados en base a la secuencia de cada uno de los péptidos ALDO, ARELI y SAK, fueron de 0.545, 0.315 y 0.364 kcal/mol respectivamente, lo que indica que son fuertes candidatos a formar hélices α anfipáticas. Estos valores de μH concuerdan con lo observado en sus representaciones helicoidales, mostrando una distribución asimétrica de aminoácidos hidrofóbicos (Fig.5). En la tabla 2 se muestran las propiedades químicas, físicas y estructurales de los péptidos ALDO, ARELI y SAK.

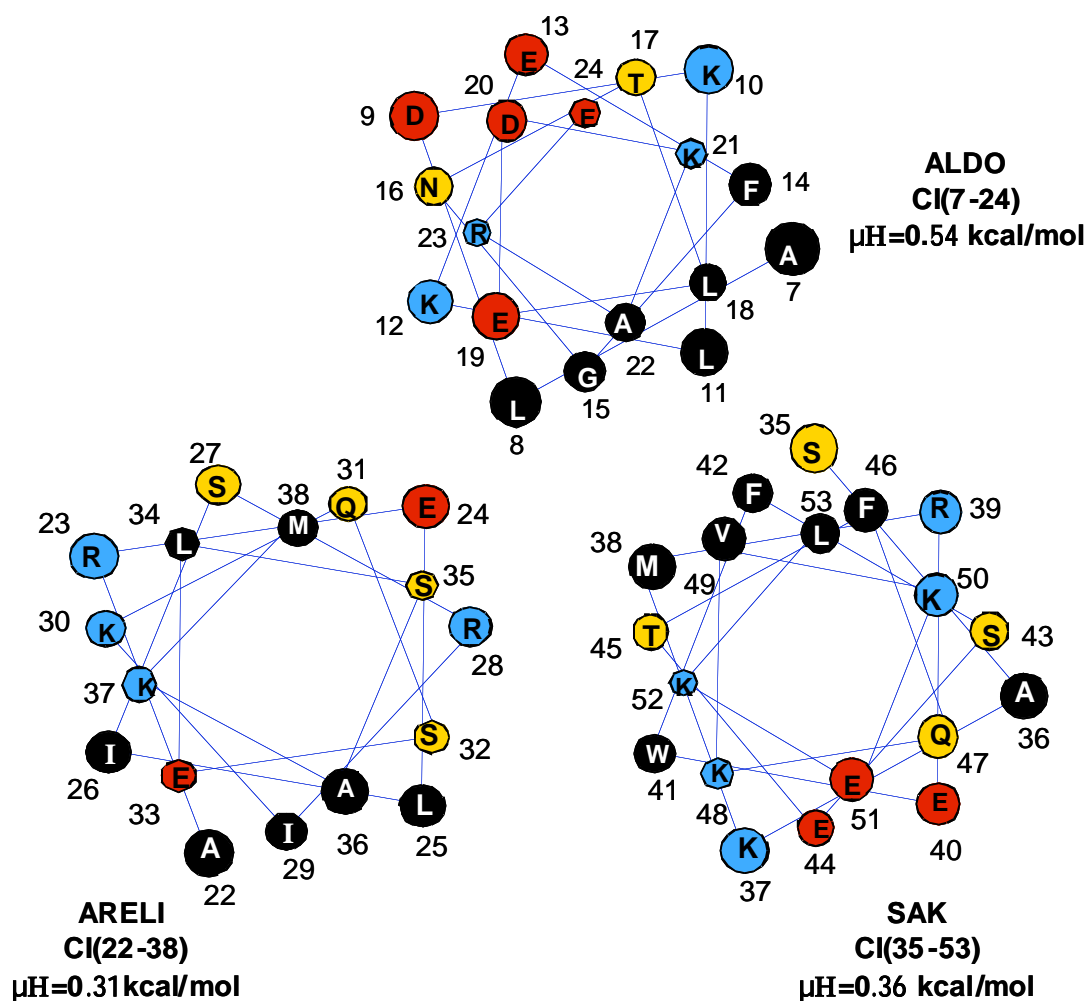


Fig.5. Proyección de giros helicoidales de los segmentos de la apo CI en estudio ALDO(7-24), ARELI (22-38) y SAK (35-53). Aminoácido: ●hidrofóbico, ●positivamente cargado, ●negativamente cargado, ●polar sin carga.



Tabla 2: Propiedades químicas, físicas y estructurales de los péptidos ALDO, ARELI y SAK.

| Segmento | | | ALDO (7-24) | ARELI (22-38) | SAK (35-53) |
|---|----------|----------|----------------|----------------|----------------|
| No. aa | | | 18 | 17 | 19 |
| PM (Da) | | | 2001.6 | 1890.4 | 2112.8 |
| PI | | | 4.73 | 10.57 | 9.88 |
| ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$) | | | ----- | ----- | 5690 |
| Momento Hidrofóbico μH (Kcal/mol residuo) | | | 0.545 | 0.315 | 0.364 |
| Tipo de Hélice | | | A ₂ | A ₂ | A ₂ |
| Carga neta | | | -1 | +2 | +3 |
| Tipo de aminoácidos | | | | | |
| Aromáticos | | | 1 | 0 | 3 |
| α | <i>H</i> | <i>a</i> | | | |
| h_{α} | 1.19 | F | 1 | | 2 |
| h_{α} | 0.81 | W | | | 1 |
| b_{α} | 0.26 | Y | | | |
| No polar, alifático | | | 6 | 7 | 4 |
| I_{α} | 1.38 | I | | 2 | |
| h_{α} | 1.08 | V | | | 1 |
| H_{α} | 1.06 | L | 3 | 2 | 1 |
| h_{α} | 0.64 | M | | 1 | 1 |
| H_{α} | 0.62 | A | 2 | 2 | 1 |
| B_{α} | 0.48 | G | 1 | | |
| B_{α} | 0.12 | P | | | |
| Polar, sin carga | | | 2 | 4 | 4 |
| h_{α} | 0.29 | C | | | |
| i_{α} | -0.05 | T | 1 | | 1 |
| i_{α} | -0.18 | S | | 3 | 2 |
| b_{α} | -0.78 | N | 1 | | |
| h_{α} | -0.85 | Q | | 1 | 1 |
| Cargados (+) | | | 4 | 4 | 5 |
| I_{α} | -0.40 | K | 3 | 2 | 4 |
| h_{α} | -1.50 | H | | | |
| i_{α} | -2.53 | R | 1 | 2 | 1 |
| Cargados (-) | | | 5 | 2 | 3 |
| i_{α} | -0.74 | E | 3 | 2 | 3 |
| H_{α} | -0.90 | D | 2 | | |

--- No tiene aminoácidos W, Y o C por lo cual no es visible en un espectrómetro de UV. $\alpha = H_{\alpha}$ fuerte formador de hélice α , h_{α} formador de hélice α , I_{α} débil formador de hélice α , i_{α} indiferente en formar hélice α , b_{α} impide la formación de hélice α , B_{α} impide fuertemente la formación de hélice α . H= Hidrofobicidad, datos de Eisenberg et al. 1989. a = aminoácido, F= Fenilalanina, W=Triptofano, Y=Tirosina, I=Isoleucina, V=Valina, L=Leucina, M=Metionina, A=Alanina, G=Glicina, P=Prolina, C=Cisteína, T=Treonina, S=Serina, N=Asparagina, Q=Glutamina, K=Lisina, H=Histidina, R=Arginina, E=Glutamato, D=Aspartato.



Analizando los datos de la tabla, se puede observar que ALDO es el que presenta el mayor valor de μH , lo que teóricamente indica que es el más apto para formar hélices α de tipo anfipático. Solo cuenta con un aminoácido de tipo aromático y contiene siete aminoácidos propuestos como fuertes inductores de conformación hélice α , prácticamente son la mitad de los aminoácidos que lo constituyen. El péptido ARELI presenta un valor de μH que teóricamente indica que puede formar estructuras del tipo hélice α , pero no posee aminoácidos del tipo aromático lo cual ha sido propuesto como una característica muy importante para estabilizar este tipo de estructuras (Rozek et al. 1995). Contiene cuatro aminoácidos propuestos como fuertes inductores de conformación hélice α y ninguno que le impida la formación de este tipo de estructuras. SAK es el más favorecido para formar estructuras hélice α de tipo anfipático ya que, aunque su valor de μH es muy similar al del péptido ARELI, contiene el mayor número de aminoácidos aromáticos de los tres péptidos. Además no contiene aminoácidos que sean del tipo que impidan la formación de hélices α . Los tres péptidos pertenecen a la clase de hélices α anfipáticas tipo A, donde la región ocupada por la parte hidrofílica sobre la parte hidrofóbica de la hélice es mayor.

A continuación se muestran y discuten los espectros obtenidos por la técnica de DC correspondientes a los ensayos de los péptidos ALDO, ARELI y SAK en solución acuosa y en presencia de las moléculas PC, DHPC, Liso- C_{12} PC, Liso- C_6 PC, TFE y SDS a concentraciones en las cuales se observa un efecto muy evidente en su estructura secundaria. Los demás espectros se incluyeron en el Apéndice.

Al colocar a los péptidos ALDO, ARELI y SAK en agua observamos que son completamente solubles y que además presentan espectros de DC característicos de una proteína completamente desestructurada (Fig.6), a diferencia de la apolipoproteína CI, la cual presenta en este mismo medio un espectro característico de una proteína con estructura hélice α (inserto Fig.6).

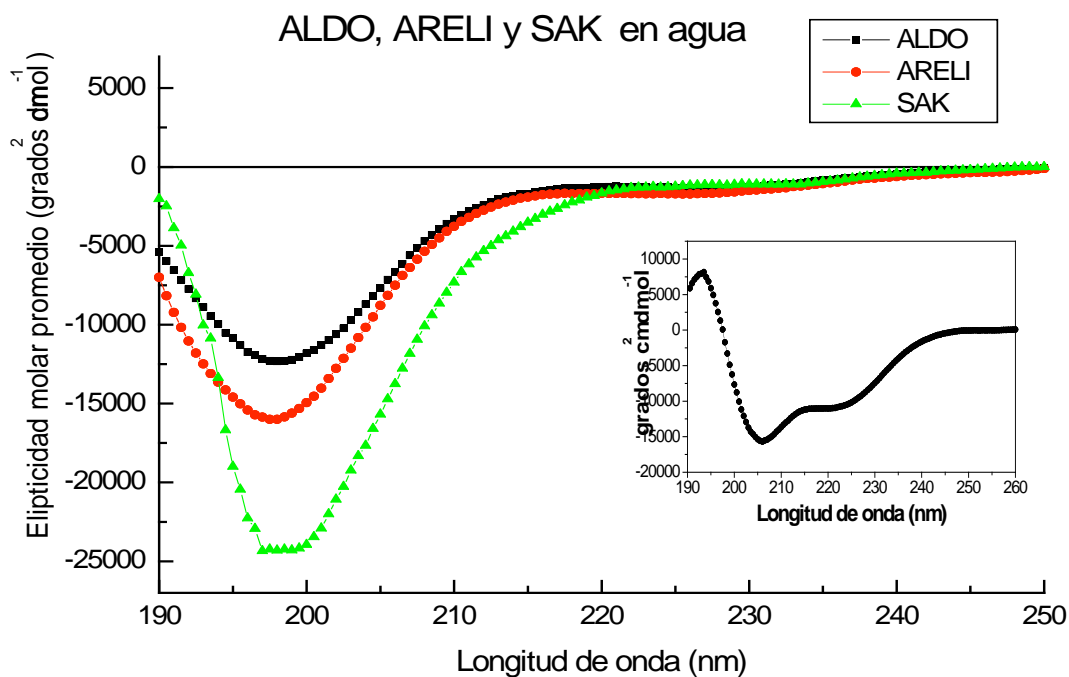


Fig.6. Estimación del contenido de estructura secundaria de ALDO, ARELI y SAK en una concentración de $200\mu\text{g/ml}$ en agua.

Se evaluó la estructura secundaria de los péptidos ALDO, ARELI y SAK en presencia de TFE y SDS a diferentes concentraciones, los cuales fueron utilizados como controles positivos. Para el caso de ALDO y ARELI en presencia de 40% v/v de TFE o concentraciones mayores, se observaron espectros con señales características de una proteína hélice α (mínimos en 208 y 222; Greenfield et al. 1969) acentuándose las señales con un 80% v/v de TFE (Fig.7). Con el péptido SAK se observa el espectro característico de una proteína hélice α desde la concentración más baja utilizada de TFE (20% v/v), acentuándose la señal a una concentración de 80% v/v (Fig.7).



ALDO, ARELI y SAK en TFE

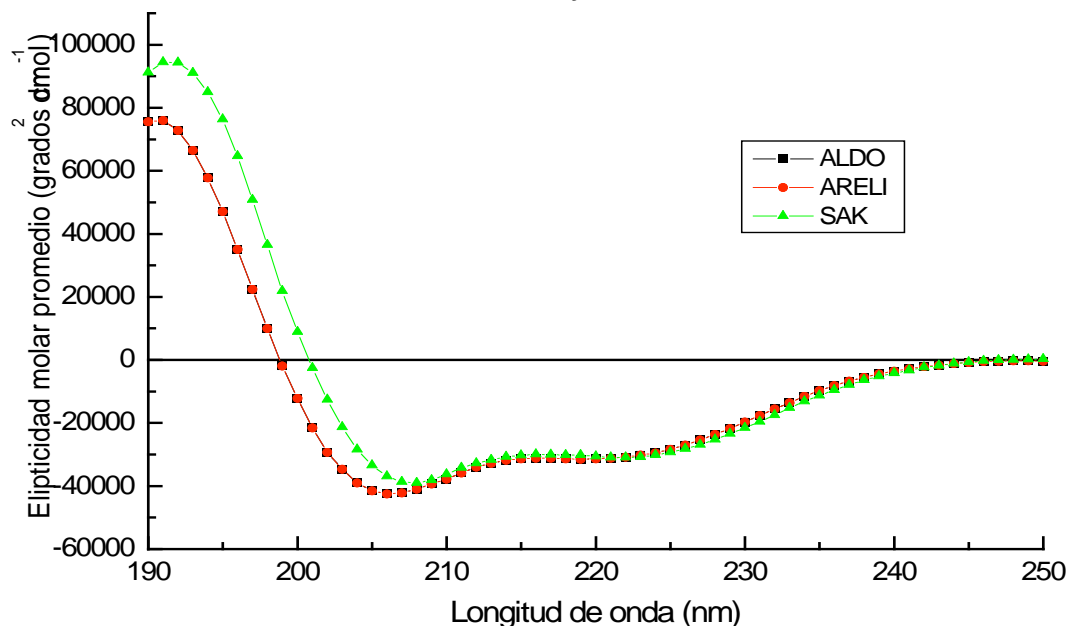


Fig.7. Estimación del contenido de estructura secundaria hélice α de ALDO, ARELI y SAK en TFE 80% v/v.

El mecanismo por el cual el TFE confiere estructura secundaria hélice α es diferente al de los lípidos y se ha postulado que puede ser: a) mediante la interacción directa del TFE con la cadena polipeptídica, b) por la asociación preferencial con sitios hidrofóbicos en la superficie de las proteínas, lo cual concuerda con los datos de solubilidad de los diferentes aminoácidos en alcoholes y c) induciendo interacciones intermoleculares en la cadena polipeptídica al afectar la estructura de agua y asociarse con la superficie hidrofóbica de una hélice mimetizando el ambiente de una membrana o el interior de una proteína (Luo y Baldwin, 1997; Buck, 1998; Reiersen y Rees, 2000).

En presencia de SDS a partir de la concentración experimental más baja (1.5mM), que es una concentración por debajo de su CMC se obtuvieron espectros de DC característicos de una proteína hélice α para los péptidos ALDO, ARELI y SAK. Los



espectros de DC para los tres péptidos se observan más definidos a una concentración 20mM de SDS que es una concentración por arriba de su CMC (Fig. 8).

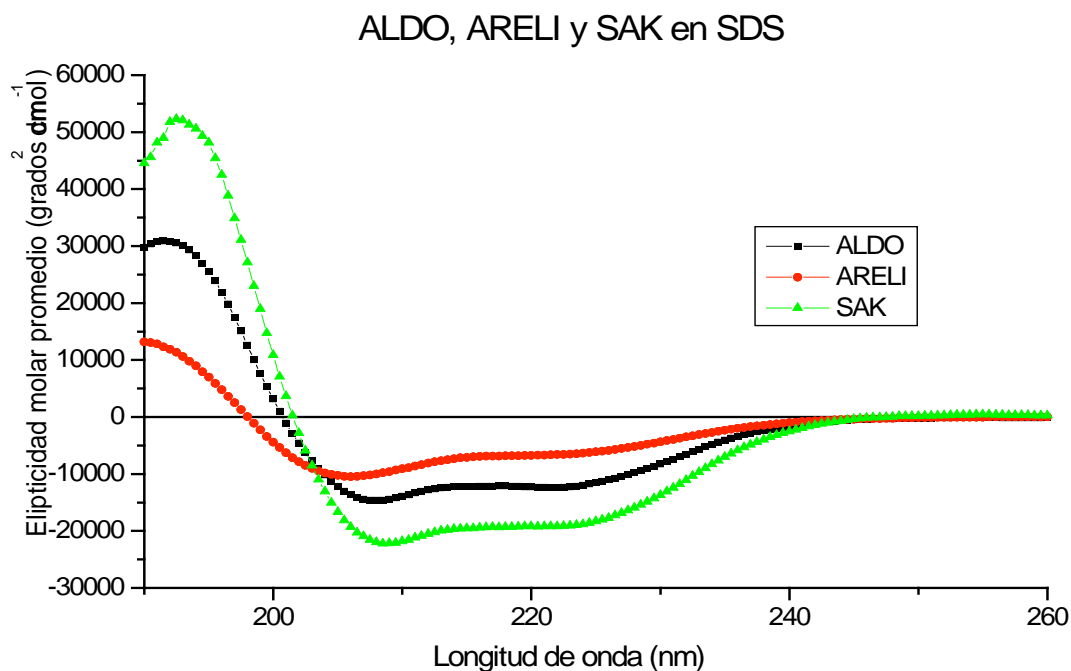


Fig.8. Estimación del contenido de estructura secundaria hélice α de ALDO, ARELI y SAK en SDS 20Mm.

En la literatura está documentado que el detergente SDS induce y estabiliza la estructura secundaria de péptidos y proteínas principalmente de tipo hélice α . Por lo anterior concentraciones micelares de SDS se han utilizado en investigaciones sobre péptidos con un alto potencial de formar estructuras secundarias ordenadas (Wu et al. 1990; Young et al. 1997), así como en regiones de proteínas desplegadas involucradas en procesos de reconocimiento (Montserret et al. 2000). Se ha observado que la inducción a hélice α en péptidos por SDS, en concentraciones por debajo de su CMC depende de la fuerza iónica (Brito et al. 1986). Observando el efecto que tuvo el detergente SDS sobre los péptidos ALDO, ARELI y SAK se buscó una molécula fisiológica con una estructura química parecida a este detergente, por lo cual se utilizó la molécula Liso-C₁₂PC. El Liso-C₁₂PC es un lisofosfolípido que se encuentra en las membranas celulares y sirve como mediador de múltiples respuestas biológicas por



medio de receptores acoplados a proteína G. (Torkhovskaya et al. 2007). De igual forma, funciona como modulador de la unión de HDL a macrófagos y estimulador del flujo de colesterol de estas células a las HDL (Negre-Salvayre et al. 2006; Duong et al. 2004) promoviendo de esta forma un mecanismo antiaterogénico. Las concentraciones de Liso-C₁₂PC que se utilizaron en estos experimentos fueron por arriba de su CMC (0.9mM). Se observó con el péptido ALDO en presencia de Liso-C₁₂PC (20mM) un espectro de DC característico de una proteína hélice α . En cambio el péptido SAK presenta este tipo de espectros desde la concentración más baja utilizada (1.5mM). Sin embargo, ARELI no presenta cambios conformacionales con ninguna concentración ensayada de este detergente (Fig. 9). Al adicionar unos cuantos microlitros de colesterol disuelto en cloroformo a las muestras de Liso-C₁₂PC con péptido, observamos prácticamente los mismos espectros para cada péptido. La presencia de colesterol no indujo efecto alguno en la estructura secundaria de los péptidos.

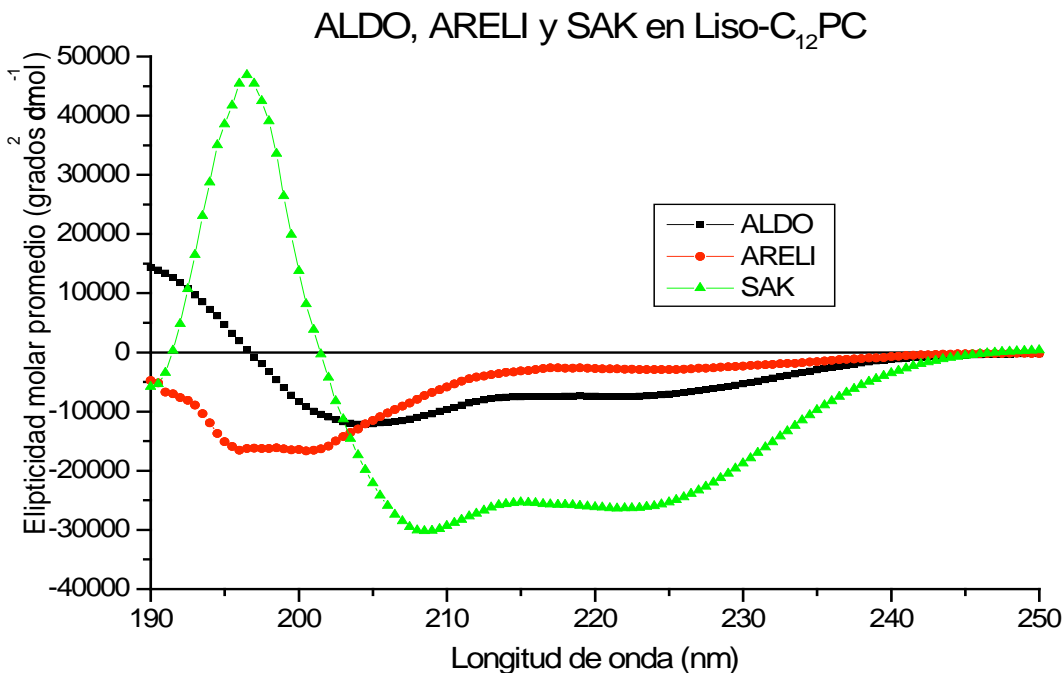


Fig.9. Estimación del contenido de estructura secundaria hélice α de ALDO, ARELI y SAK en Liso-C₁₂PC 20 mM.



El fosfolípido PC es el lípido que se encuentra en mayor proporción en la superficie de la membrana celular así como en las lipoproteínas, por lo cual es una molécula fisiológica que se utiliza ampliamente para mimetizar este tipo de estructuras (Sabín 2006). Los espectros de DC observados para los péptidos ALDO, ARELI y SAK en presencia de PC por arriba de su CMC fueron semejantes a los de estos mismos péptidos en agua (Fig.10).

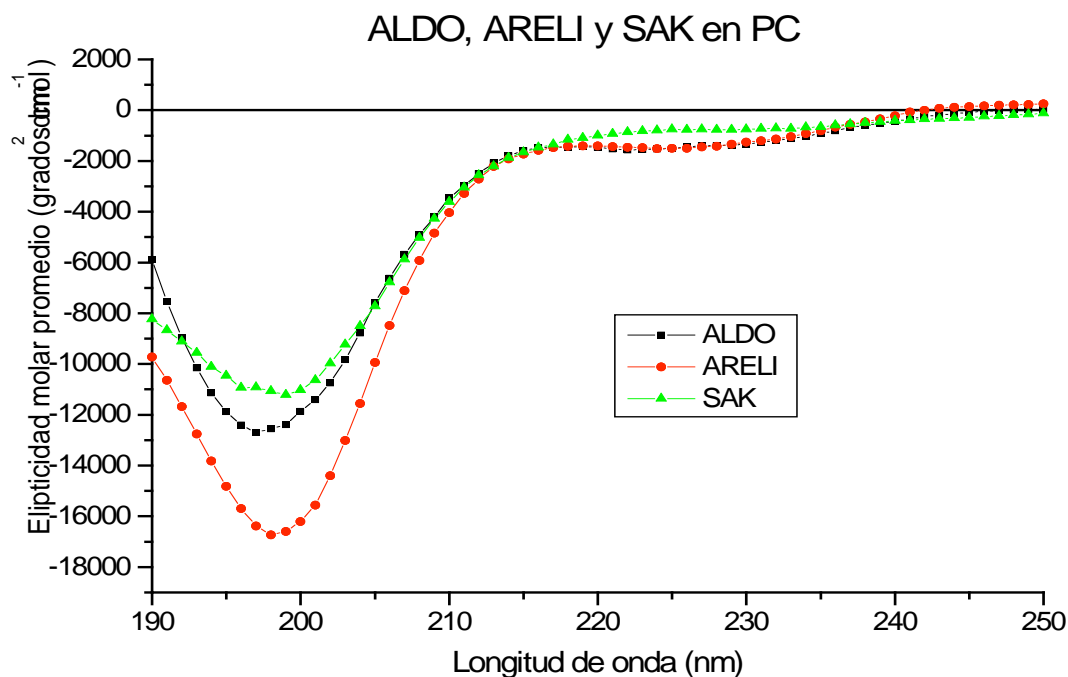


Fig.10. Estimación del contenido de estructura secundaria hélice α de ALDO ARELI y SAK en PC 0.050 mM.

Diversos factores probablemente influyeron para que los péptidos no presentaran cambios conformacionales. Entre estos factores se consideran la carga y la forma de estas estructuras lipídicas. A pH básico la superficie de membranas de PC presenta cargas negativas y en pH ácido presenta cargas positivas debido a los grupos $-N^+(\text{CH}_3)_3$ y $-(\text{PO})^{(-)}$ que se encuentran en la cabeza de colina y que interaccionan con OH^- o H^+ respectivamente (Atcliffe et al. 2001). El pH de trabajo fue entre 5.8 y 6.3, por lo cual predominarían las cargas positivas en la superficie de las estructuras lipídicas de PC. Utilizando un algoritmo (EMBL WWW Gateway to Isoelectric Point Service) se



calculó teóricamente la carga de los péptidos en el pH de trabajo. Para el péptido ALDO se obtuvo un valor de -0.795 a -0.979, para ARELI de 2.10 a 2.01 y para SAK de 1.10 a 1.01. La distribución de cargas que tiene cada péptido probablemente no permitió una fuerte interacción electrostática con la superficie de la membrana de PC. Lo anterior, aunado a que el fosfolípido PC forma estructuras compactas (Wieprecht T. et al. 2002), pudo influir en que los péptidos no interaccionaran adecuadamente con estas estructuras para adquirir una conformación de hélice α . Las estructuras micelares que se obtienen con SDS y Liso- C_{12} PC en comparación con las que se obtienen con PC son menos rígidas (Atcliffe et al. 2001). Esto podría ser un factor para inducir interacciones entre las cadenas hidrocarbonadas del fosfolípido y el péptido. Por otro lado, los péptidos ALDO, ARELI y SAK carecen o tienen pocos aminoácidos aromáticos que les permitan interaccionar con las cadenas hidrocarbonadas del fosfolípido PC. Además pertenecen a la clase estructural A_2 y se ha reportado que este tipo de hélices inducen una curvatura positiva sobre membranas lipídicas, lo cual podría estar impedido por la forma de las estructuras de PC, que tienden a ser discoidales y por lo cual su superficie es plana (Wieprecht T. et al. 2002).

Otro factor que altera las propiedades físicas de las membranas, además de la fuerza iónica y el pH, es la presencia de colesterol. Los péptidos ALDO y ARELI en presencia de PC más colesterol a 25°C, mostraron espectros de proteínas desestructuradas. Sólo el péptido SAK presentó un desplazamiento de la curva hacia la derecha a 205 nm, pero este mínimo no es característico de una conformación helice α (Fig.11). El efecto que tiene el colesterol en las membranas de PC por arriba de su T_c (-15°C) se sabe que es debido a que esta molécula conformada por un grupo 3-B-hidroxil, un núcleo esteroide planar y una cadena alifática lateral, induce en las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos una disminución de movilidad con una consecuente disminución del área y la fluidez de la membrana (Beattie et al. 2005), lo que hace a estas estructuras lipídicas todavía menos aptas para interaccionar con los péptidos, en comparación con las constituidas únicamente por PC.

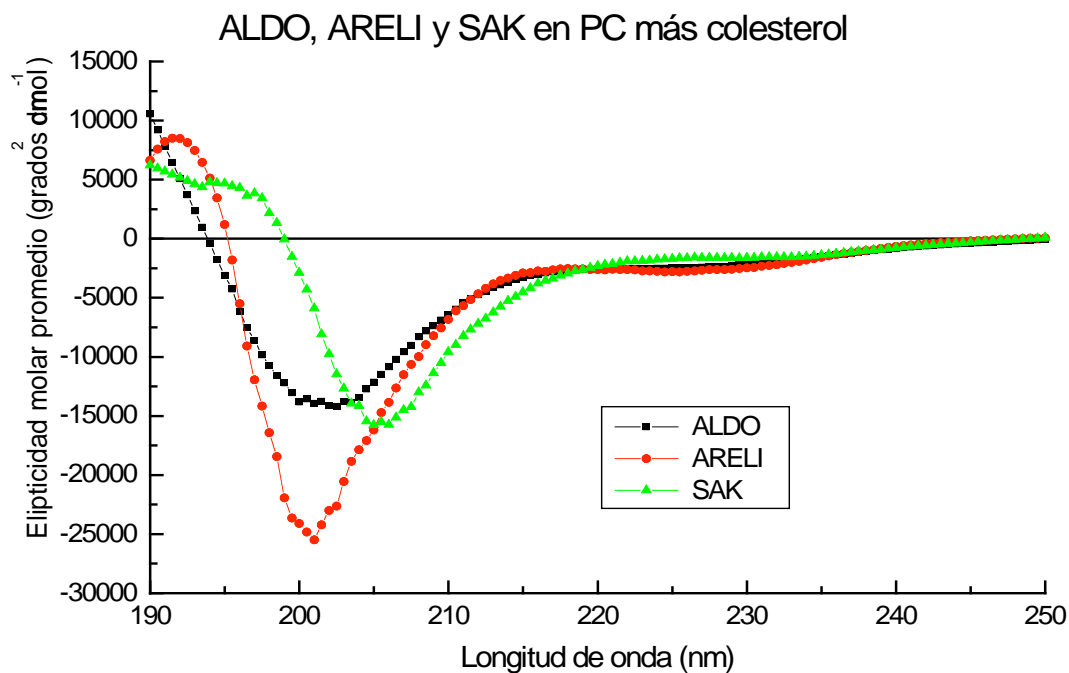


Fig.11. Estimación del contenido de estructura secundaria hélice α de ALDO, ARELI y SAK en PC 0.050 mM más colesterol.

Para estudiar el efecto de las colas acílicas de los fosfolípidos y lisofosfolípidos sobre la estructura secundaria de los péptidos ALDO, ARELI y SAK, se realizaron experimentos en presencia del fosfolípido DHPC y el lisofosfolípido Liso-C₆PC por debajo de su CMC, 15mM y >114mM respectivamente.

En presencia de DHPC en una concentración 14mM, sólo el péptido SAK mostró un espectro con mínimos que indican un contenido de estructura hélice α ; en cambio ALDO y ARELI presentan espectros característicos de una proteína desestructurada (Fig.12). Probablemente el efecto que se observa en SAK es debido a agregados de este fosfolípido que interactúan con el péptido SAK de forma más favorable que con los otros dos péptidos, ya que 14 mM es una concentración cercana a la CMC del DHPC. En presencia de DHPC con colesterol, los tres péptidos presentan espectros de DC característicos de una proteína desestructurada. (Fig.13).

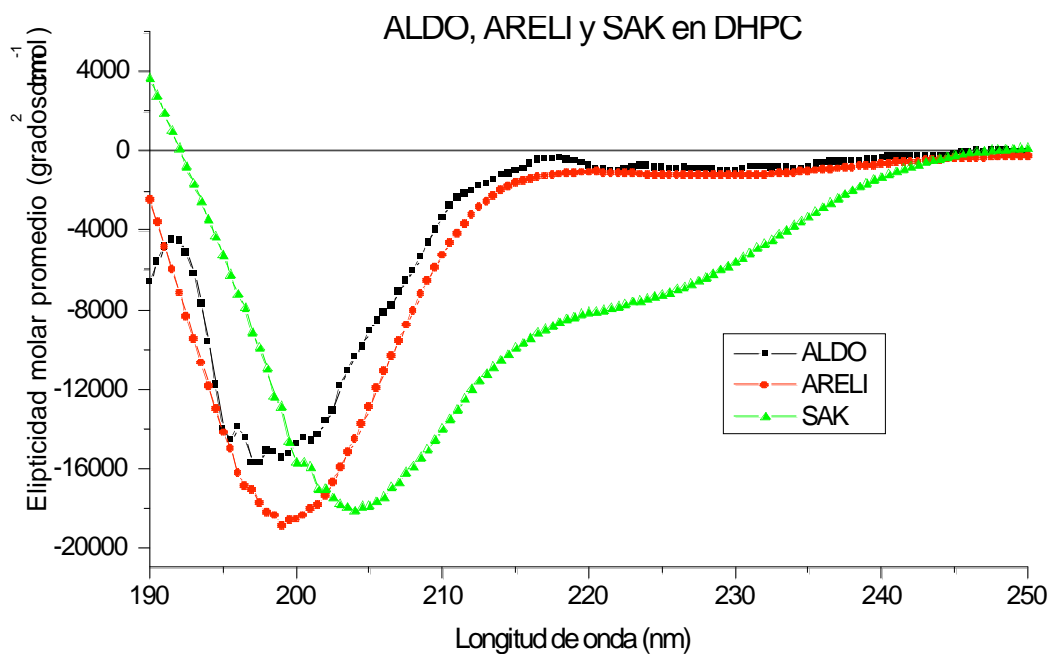


Fig.12. Estimación del contenido de estructura secundaria hélice α de ALDO, ARELI y SAK en DHPC 14 Mm.

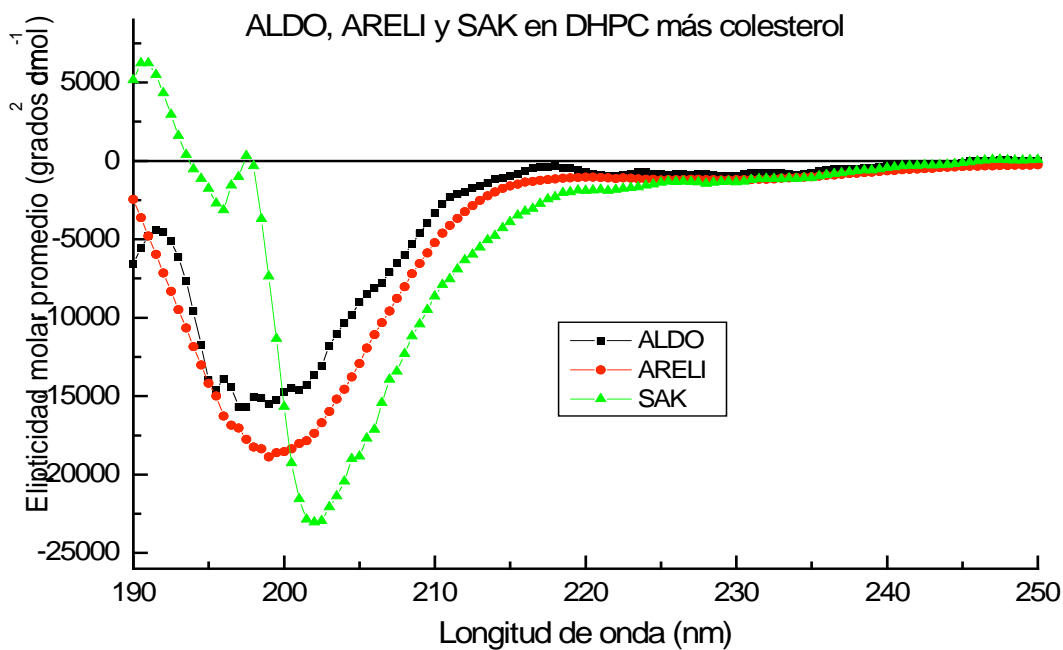


Fig.13. Estimación del contenido de estructura secundaria hélice α de ALDO, ARELI y SAK en DHPC 14 mM y colesterol.



Los tres péptidos con el lisofosfolípido Liso-C₆PC (20mM) en presencia y ausencia de colesterol presentan espectros de DC característicos de una proteína desestructurada.

(Figs. 14 y 15).

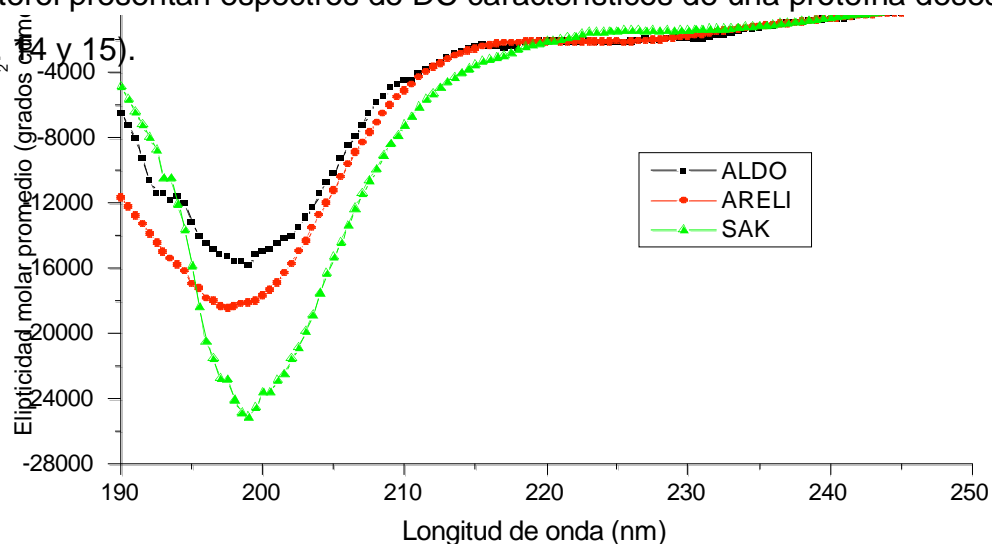


Fig.14. Estimación del contenido de estructura secundaria hélice α de ALDO, ARELI y SAK en Liso-C₆ PC 20 mM

ALDO, ARELI y SAK en Liso-C₆PC más colesterol

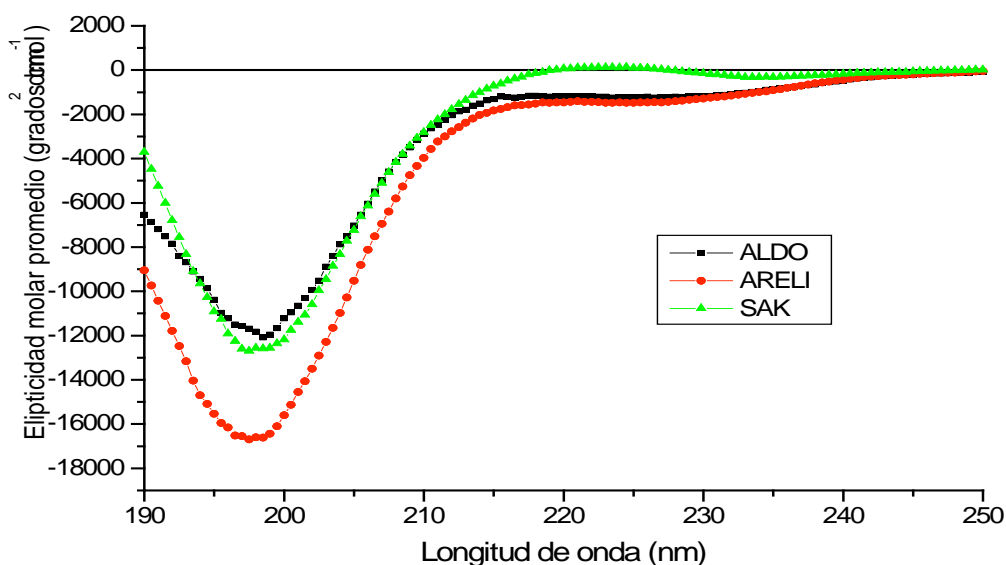


Fig.15. Estimación del contenido de estructura secundaria hélice α de ALDO, ARELI y SAK en Liso-C₆PC 20 mM y colesterol.



Probablemente el fosfolípido DHPC y el lisofosfolípido Liso-C₆PC por debajo de su CMC no inducen cambios conformacionales a hélice α , en los péptidos ALDO, ARELI y SAK debido a que estos lípidos presentan una cabeza zwitteriónica de colina muy voluminosa y no pueden formar interacciones iónicas con los péptidos, a diferencia del SDS el cual presenta una cabeza polar de sulfato, de menor tamaño (Brito et al. 1986).

A continuación se muestra un resumen de los porcentajes de estructura hélice α de los péptidos ALDO, ARELI y SAK en los diferentes medios ensayados (Tabla 3).

Tabla.3 Efecto de diferentes familias de lípidos en la estructura secundaria de péptidos derivados de apo Cl.

| Fosfolípido | Péptido | Concentración de Fosfolípido | % Estructura hélice α | | |
|---|---------|------------------------------|------------------------------|-------------|--------------------------|
| | | | H ₂ O | Fosfolípido | Fosfolípido + Colesterol |
| L- α -Fosfatidilcolina (PC) | ALDO | 50 μ M | 10.9 | 11.7 | 14.3 |
| | ARELI | | 12.0 | 11.1 | 14.4 |
| | SAK | | 8.4 | 11.8 | 12.7 |
| 1,2-Dihexanoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DHPC) | ALDO | 14 mM | 10.9 | 12.0 | 10.2 |
| | ARELI | | 12.0 | 9.3 | 10.6 |
| | SAK | | 8.4 | 28.0 | 12.2 |
| 1-Lauril-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (Liso 12PC) | ALDO | 20 mM | 10.9 | 24.4 | 26.9 |
| | ARELI | | 12.0 | 14.9 | 15.0 |
| | SAK | | 8.4 | 75.4 | 60.1 |
| 1-Hexanoil-2-Hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (Liso 6 PC) | ALDO | 20 mM | 10.9 | 11.7 | 11.5 |
| | ARELI | | 12.0 | 10.4 | 12.2 |
| | SAK | | 8.4 | 12.3 | 9.6 |
| Control (moléculas que inducen a hélice α) | Péptido | Concentración Control | % Estructura hélice α | | |
| | | | H ₂ O | Control | |
| Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) | ALDO | 20 mM | 10.9 | 39.4 | — |
| | ARELI | | 12.0 | 24.6 | — |
| | SAK | | 8.4 | 73.3 | — |
| 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) | ALDO | 80% | 10.9 | 86.8 | — |
| | ARELI | | 12.0 | 86.8 | — |
| | SAK | | 8.4 | 87.2 | — |



Los resultados obtenidos nos indican que el contenido de aminoácidos aromáticos en los péptidos es un factor importante para inducir y estabilizar una conformación hélice α en presencia de lípidos, como es el caso de SAK, que es el péptido con más aminoácidos aromáticos y que por tanto presentó una mayor respuesta con los lípidos utilizados en este estudio. También la concentración del lípido es importante, ya que se observa que las concentraciones por arriba de la CMC de los lípidos ensayados son los que tienen una mayor inducción de estructura hélice α en los péptidos ALDO, ARELI y SAK.



7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Nuestros experimentos muestran que el lisofosfolípido Liso-C₁₂PC induce un drástico cambio en la estructura secundaria de los péptidos ALDO y SAK, que va de una forma desestructurada a la formación de hélice α . Este cambio conformacional se observó de forma más prominente en el péptido SAK, que es el segmento carboxilo de la apoCI. El lisofosfolípido Liso-C₁₂PC que presenta un hidroxilo en el carbono 1 del grupo glicerofosforilcolina que los fosfolípidos de doble cadena no tienen, pudiera ser muy importante para inducir puentes de hidrógeno intramoleculares necesarios para la consecuente formación de la hélice α . Esto nos permite concluir que la interacción fosfolípido-péptido involucra de forma más importante el grupo glicerofosforilcolina en la interfase hidrofílica/hidrofóbica de los agregados micelares estudiados que las cadenas hidrocarbonadas, las cuales más que inducir estabilizan la conformación hélice α por medio de los aminoácidos aromáticos que contienen los péptidos. En futuros experimentos, para entender mejor los cambios conformacionales de estos péptidos en presencia de lípido, se estudiará la energía (entalpía y entropía) que se requiere para llevar a cabo estos procesos, por lo cual se realizarán experimentos de microcalorimetría.



8.APÉNDICE

TABLA 1.- Péptido ALDO (% de hélice α a 222 nm)

| Fosfolípido | Concentración de fosfolípido mM | Elipticidad 222 | %hélice 222 |
|--------------------------------------|--|-----------------|-------------|
| PC | 0.0025 | -1529.85901 | 11.6 |
| | 0.005 | -1509.49609 | 11.6 |
| | 0.010 | -1435.43042 | 11.4 |
| | 0.025 | -1435.43042 | 11.4 |
| | 0.050 | -1567.09363 | 11.7 |
| PC+ colesterol | 0.050 | -2574.35059 | 14.3 |
| DHPC | 2.5 | -2756.13599 | 14.8 |
| | 5 | -2503.10425 | 14.1 |
| | 7.5 | -1916.24121 | 12.6 |
| | 10 | -1449.20251 | 11.4 |
| | 12.5 | -1834.56323 | 12.4 |
| | 14 | -1671.53198 | 12.0 |
| DHPC + colesterol | 14 | -969.55695 | 10.2 |
| LISO-C ₁₂ PC | 1.5 | -1931.65942 | 12.6 |
| | 5 | -3488.31714 | 16.6 |
| | 20 | -6532.19189 | 24.4 |
| LISO-C ₁₂ PC + colesterol | 1.5 | -2105.09155 | 13.1 |
| | 5 | -3950.18018 | 17.8 |
| | 20 | -8022.69775 | 28.3 |
| LISO-C ₆ PC | 1.5 | -1382.04858 | 11.2 |
| | 5 | -1483.55249 | 11.5 |
| | 20 | -2198.24194 | 13.3 |
| | 40 | -1547.49146 | 11.7 |
| LISO-C ₆ PC + colesterol | 1.5 | -1486.96313 | 11.5 |
| | 5 | -1038.7655 | 10.4 |
| | 20 | -1177.00525 | 10.7 |
| | 40 | -1496.42639 | 11.5 |
| | Concentración de molécula control | | |
| SDS | 1.5 mM | -12317.69629 | 39.3 |
| | 5 mM | -12417.30566 | 39.5 |
| | 20 mM | -12383.49121 | 39.4 |
| TFE | 0 % | -1261.71655 | 10.9 |
| | 20 % | -4514.41211 | 19.3 |
| | 40 % | -13410.6006 | 42.1 |
| | 80 % | -30841.541 | 86.8 |



TABLA 2.- Péptido ARELI (% de hélice α a 222 nm)

| Fosfolípido | Concentración de fosfolípido mM | Elipticidad 222 | %hélice 222 |
|--------------------------------------|--|-----------------|-------------|
| PC | 0.0025 | -1184.54712 | 10.7 |
| | 0.005 | -1213.64368 | 10.8 |
| | 0.010 | -1462.32092 | 11.4 |
| | 0.025 | -1411.76453 | 11.3 |
| | 0.050 | -1371.62 | 11.2 |
| PC+ colesterol | 0.050 | -2619.45605 | 14.4 |
| DHPC | 2.5 | -3153.44165 | 15.8 |
| | 5 | -2918.78638 | 15.2 |
| | 7.5 | -3038.61255 | 15.5 |
| | 10 | -2300.4834 | 13.6 |
| | 12.5 | -2561.02271 | 14.3 |
| | 14 | -612.769 | 9.3 |
| DHPC + colesterol | 14 | -1126.21899 | 10.6 |
| LISO-C ₁₂ PC | 1.5 | -2214.66724 | 13.4 |
| | 5 | -2320.01416 | 13.6 |
| | 20 | -2844.04834 | 15.0 |
| LISO-C ₁₂ PC + colesterol | 1.5 | -788.369 | 9.7 |
| | 5 | -471.265 | 8.9 |
| | 20 | -1651.37 | 11.9 |
| LISO-C ₆ PC | 1.5 | -1455.88452 | 11.4 |
| | 5 | -1524.28906 | 11.6 |
| | 20 | -2118.32764 | 13.1 |
| | 40 | -1757.60144 | 12.2 |
| LISO-C ₆ PC + colesterol | 1.5 | -1095.86731 | 10.5 |
| | 5 | -819.03174 | 9.8 |
| | 20 | -1433.3468 | 11.4 |
| | 40 | -1755.63586 | 12.2 |
| | Concentración de molécula control | | |
| SDS | 1.5 mM | -6605.70898 | 24.6 |
| | 5 mM | -6691.49951 | 24.8 |
| | 20 mM | -7992.49512 | 28.2 |
| TFE | 0 % | -1694.11658 | 12.0 |
| | 20% | -6541.84521 | 24.5 |
| | 40% | -15439.58691 | 47.3 |
| | 80% | -30841.54102 | 86.8 |

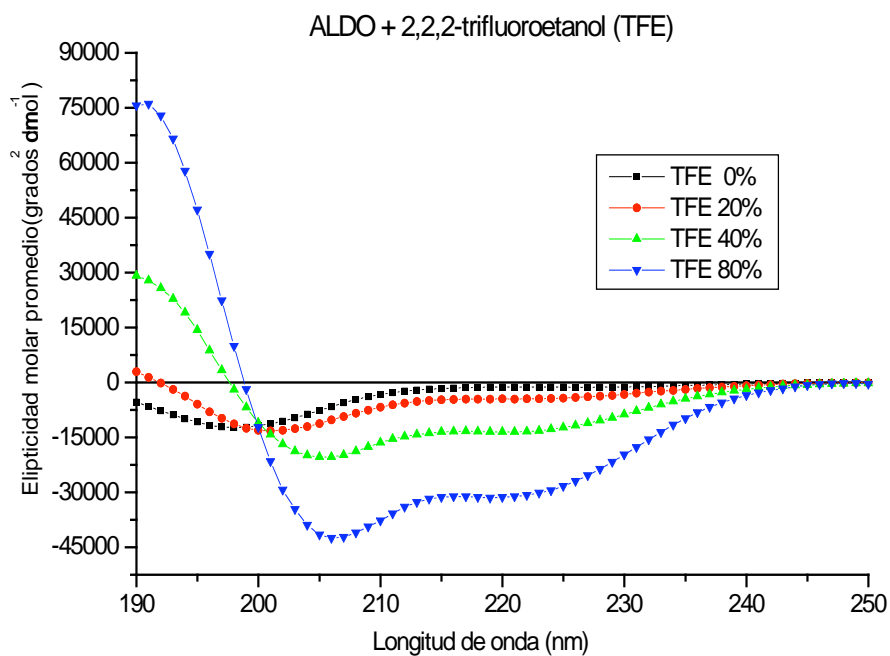


TABLA 3.- Péptido SAK (% de hélice α a 222 nm)

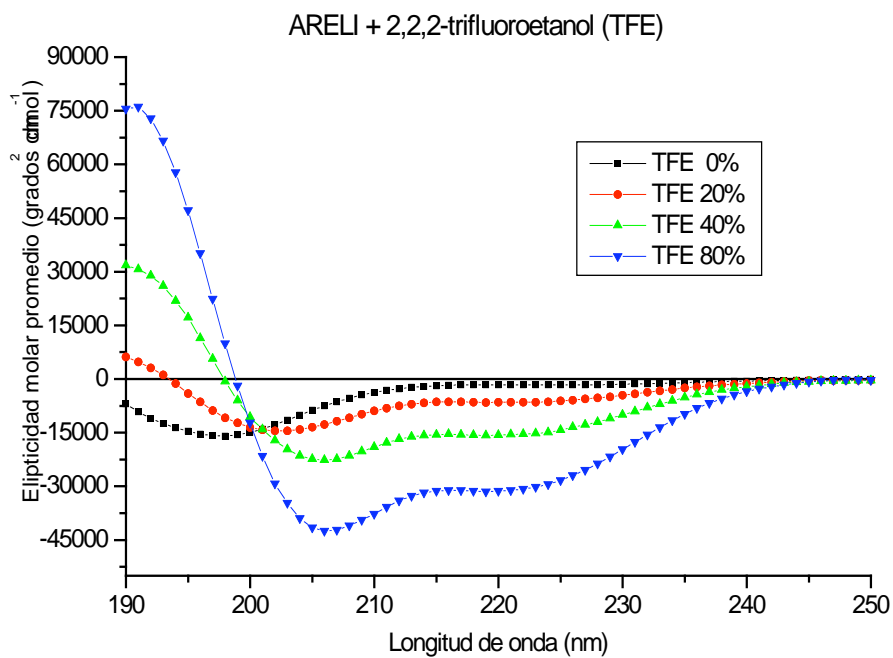
| SAK | Concentración de fosfolípido mM | Elipticidad 222 | %hélice 222 |
|--------------------------------------|--|-----------------|-------------|
| PC | 0.0025 | -761.0188 | 9.6 |
| | 0.005 | -877.31073 | 9.9 |
| | 0.010 | -881.69501 | 10.0 |
| | 0.025 | -1571.15198 | 11.7 |
| | 0.050 | -1582.69324 | 11.8 |
| PC+ colesterol | 0.050 | -1937.67773 | 12.7 |
| DHPC | 2.5 | -2975.27002 | 15.3 |
| | 5 | -2548.96558 | 14.2 |
| | 7.5 | -2622.69849 | 14.4 |
| | 10 | -2405.73291 | 13.9 |
| | 12.5 | -6739.35254 | 25.0 |
| | 14 | -7880.23047 | 27.9 |
| DHPC + colesterol | 14 | -1846.60791 | 12.4 |
| LISO-C ₁₂ PC | 1.5 | -8481.30371 | 29.4 |
| | 5 | -19589.78711 | 57.9 |
| | 20 | -26395.50195 | 75.4 |
| LISO-C ₁₂ PC + colesterol | 1.5 | -1063.54114 | 10.4 |
| | 5 | -3018.28394 | 15.4 |
| | 20 | -20445.70703 | 60.1 |
| LISO-C ₆ PC | 1.5 | -987.51831 | 10.2 |
| | 5 | -1224.01807 | 10.8 |
| | 20 | -1798.97534 | 12.3 |
| | 40 | -1692.2627 | 12.0 |
| LISO-C ₆ PC + colesterol | 1.5 | -251.93413 | 8.3 |
| | 5 | -600.76447 | 9.2 |
| | 20 | 96.8004 | 7.9 |
| | 40 | -742.19965 | 9.6 |
| | Concentración de molécula control | | |
| SDS | 1.5 mM | -19818.74805 | 58.5 |
| | 5 mM | -19923.67969 | 58.8 |
| | 20 mM | -19223.75977 | 57.0 |
| TFE | 0% | -273.58609 | 8.4 |
| | 20% | -5617.72266 | 22.1 |
| | 40% | -16153.71289 | 49.1 |
| | 80% | -30999.16992 | 87.2 |



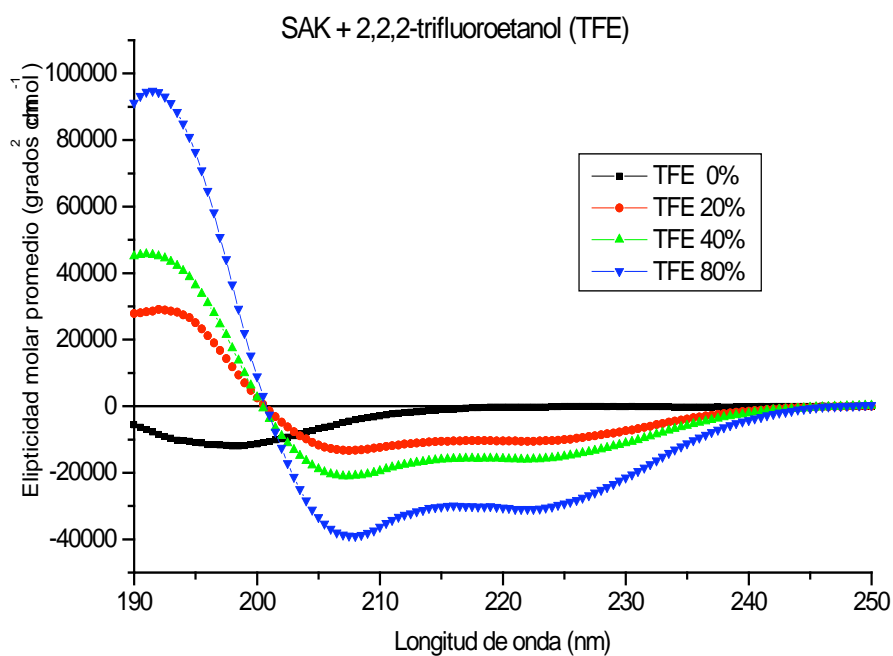
ESPECTROS DE DICROISMO CIRCULAR



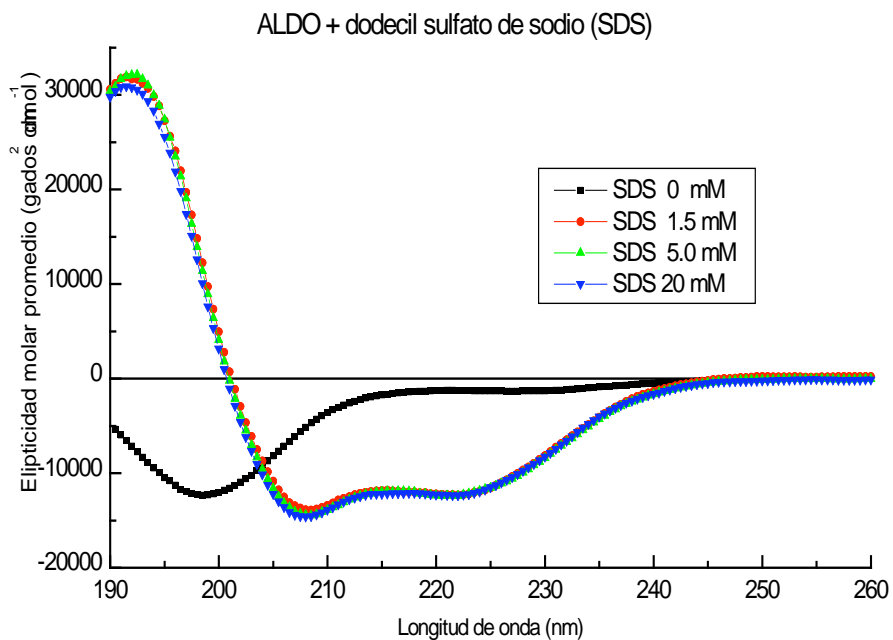
Espectro 1. Efecto de la concentración de TFE (0-80%) sobre el contenido de hélice α en el péptido ALDO.



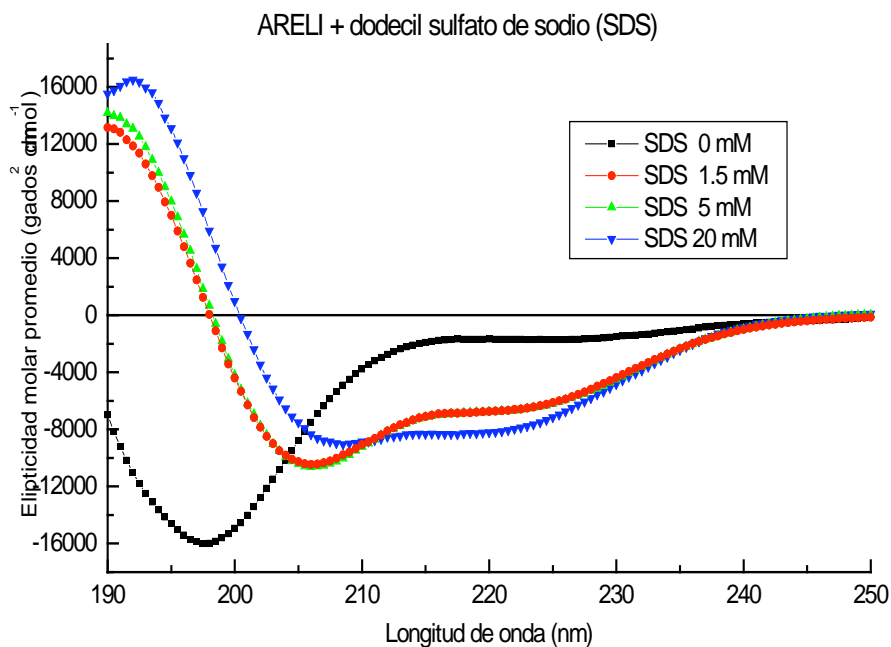
Espectro 2. Efecto de la concentración de TFE (0-80%) sobre el contenido de hélice α en el péptido ARELI.



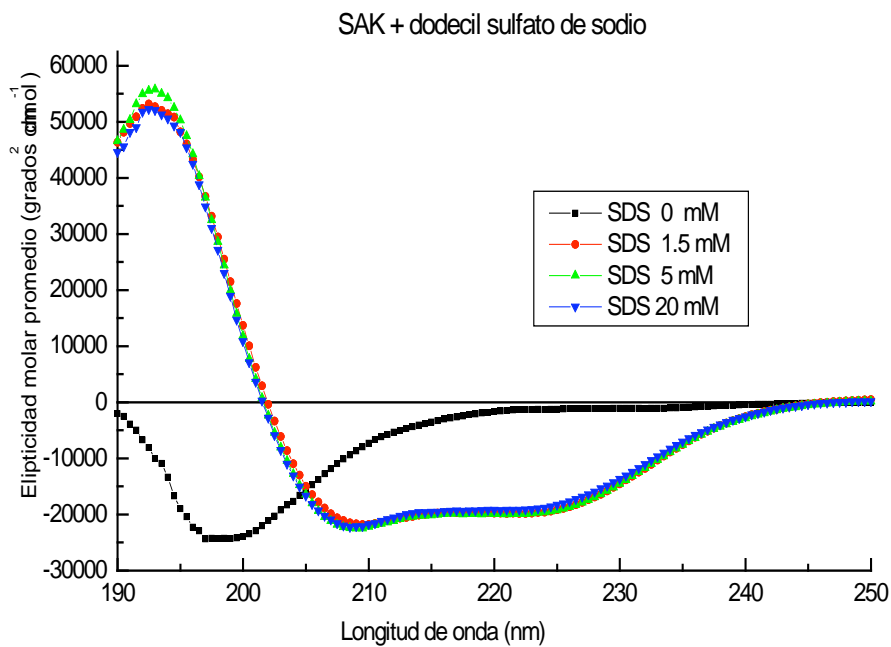
Espectro 3. Efecto de la concentración de TFE (0-80%) sobre el contenido de hélice α en el péptido SAK.



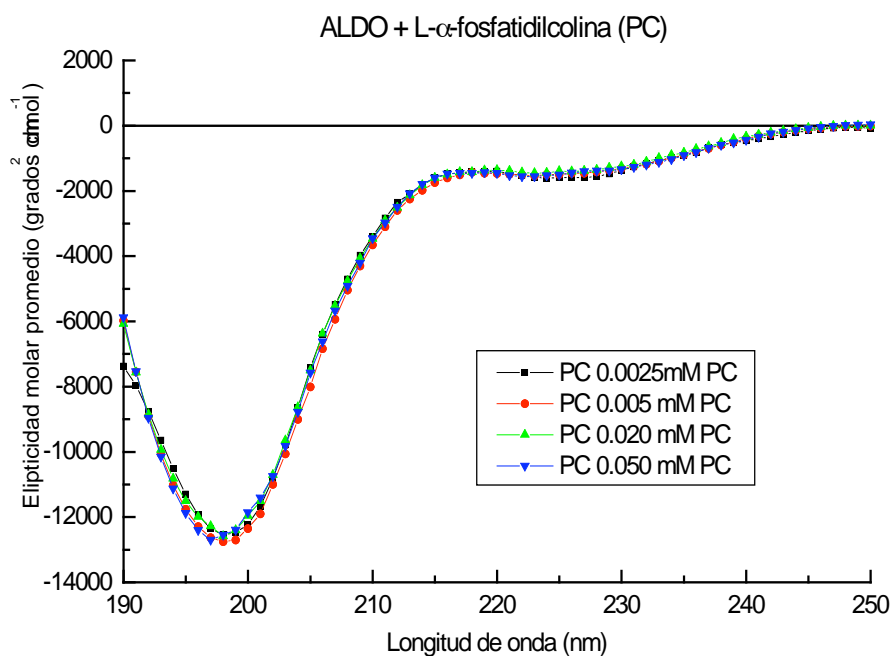
Espectro 4. Efecto de la concentración de SDS (0-20mM) sobre el contenido de hélice α en el péptido ALDO.



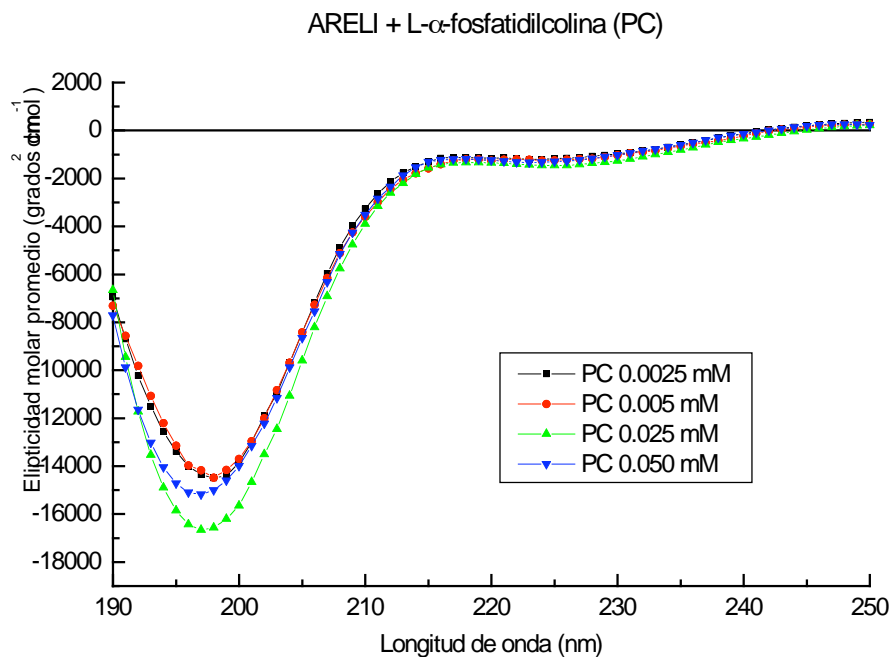
Espectro 5. Efecto de la concentración de SDS (0-20mM) sobre el contenido de hélice α en el péptido ARELI.



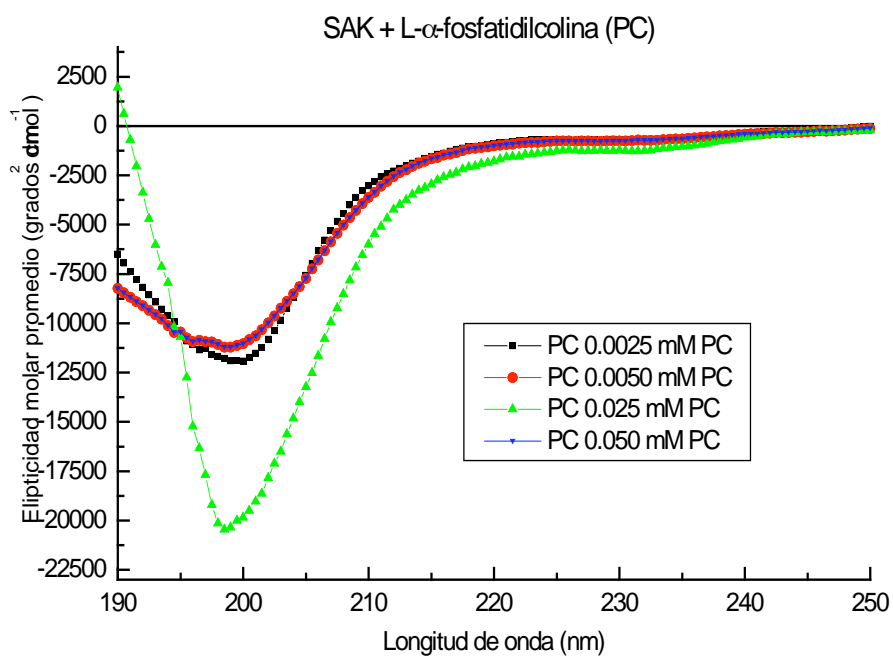
Espectro 6. Efecto de la concentración de SDS (0-20mM) sobre el contenido de hélice α en el péptido SAK.



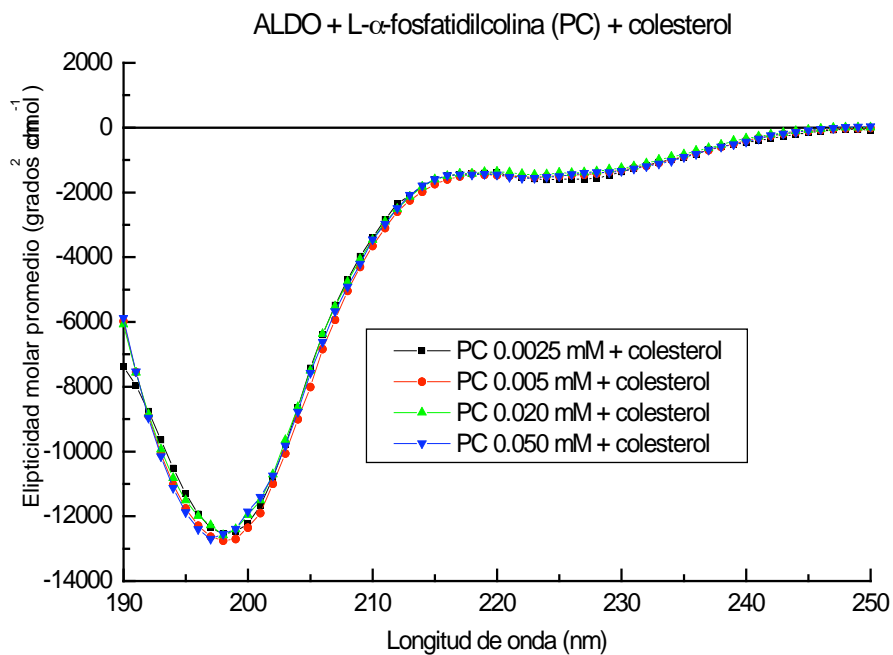
Espectro 7. Efecto de la concentración de PC (0.0025-0.050mM) sobre el contenido de hélice α en el péptido ALDO.



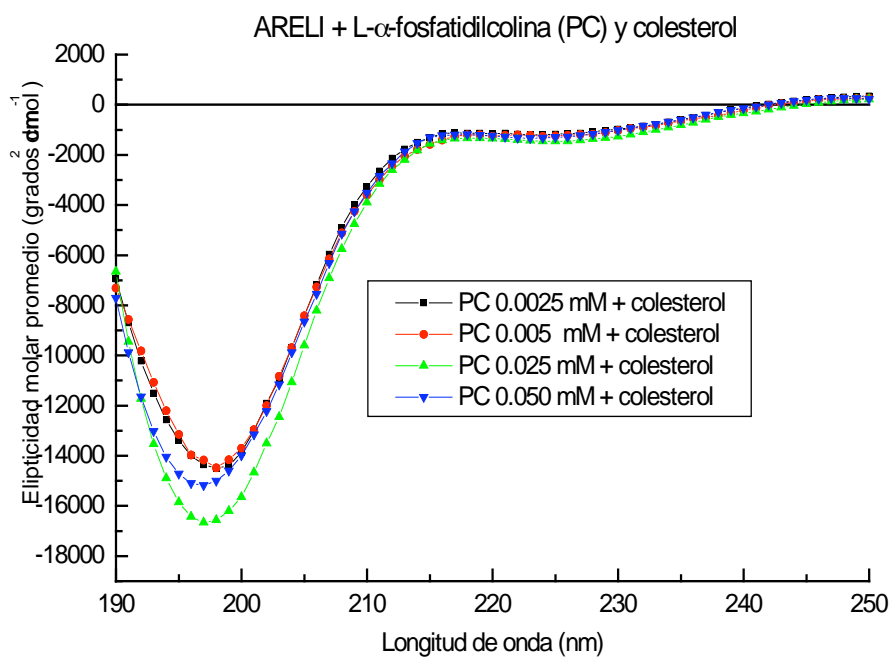
Espectro 8. Efecto de la concentración de PC (0.0025-0.050mM) sobre el contenido de hélice α en el péptido ARELI.



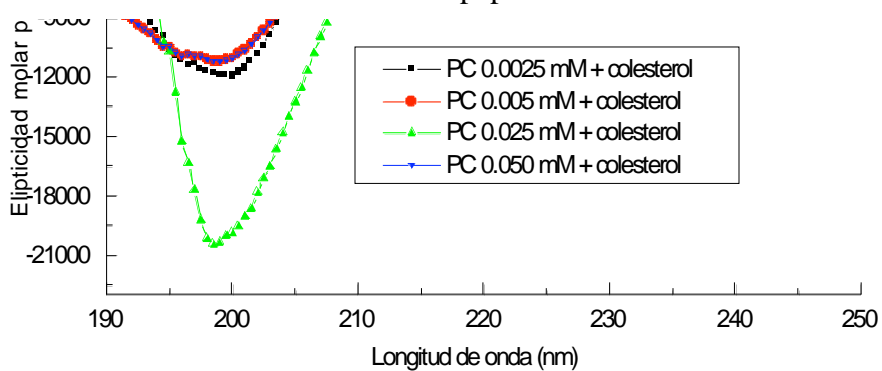
Espectro 9. Efecto de la concentración de PC (0.0025-0.050mM) sobre el contenido de hélice α en el péptido SAK.



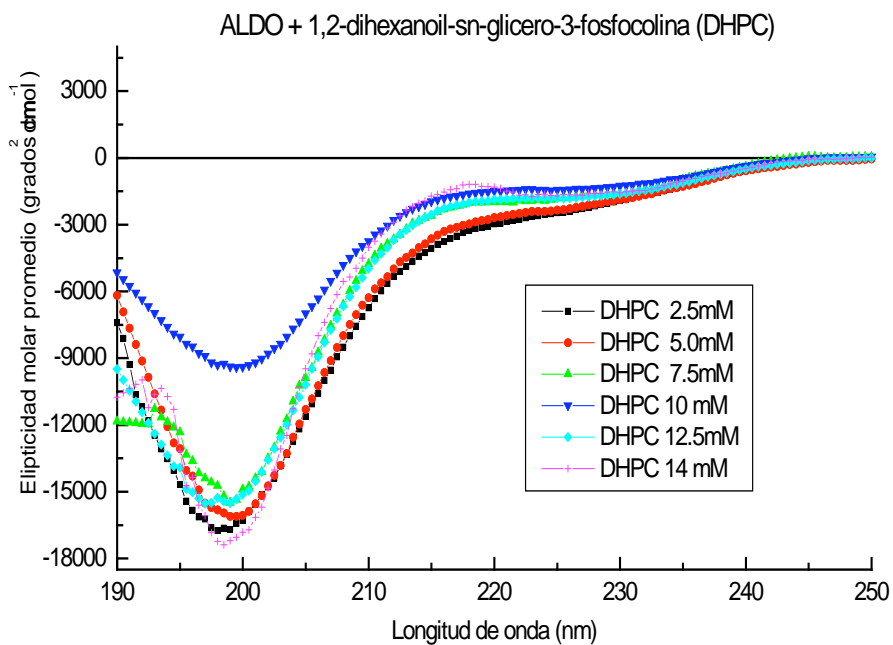
Espectro 10. Efecto de la concentración de PC (0.0025-0.050mM) y colesterol sobre el contenido de hélice α en el péptido ALDO.



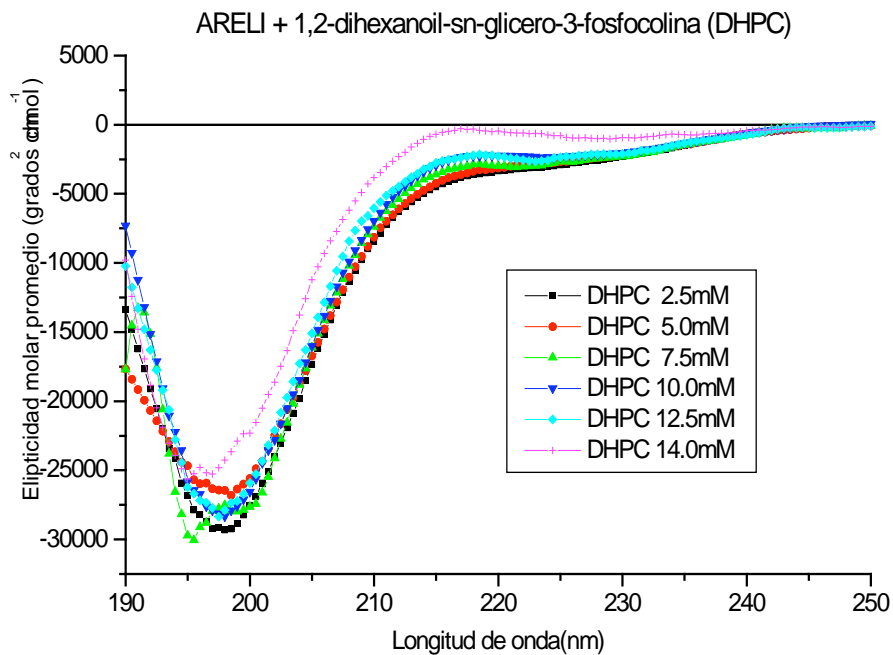
Espectro 11. Efecto de la concentración de PC (0.0025-0.050mM) y colesterol sobre el contenido de hélice α en el péptido ARELI.



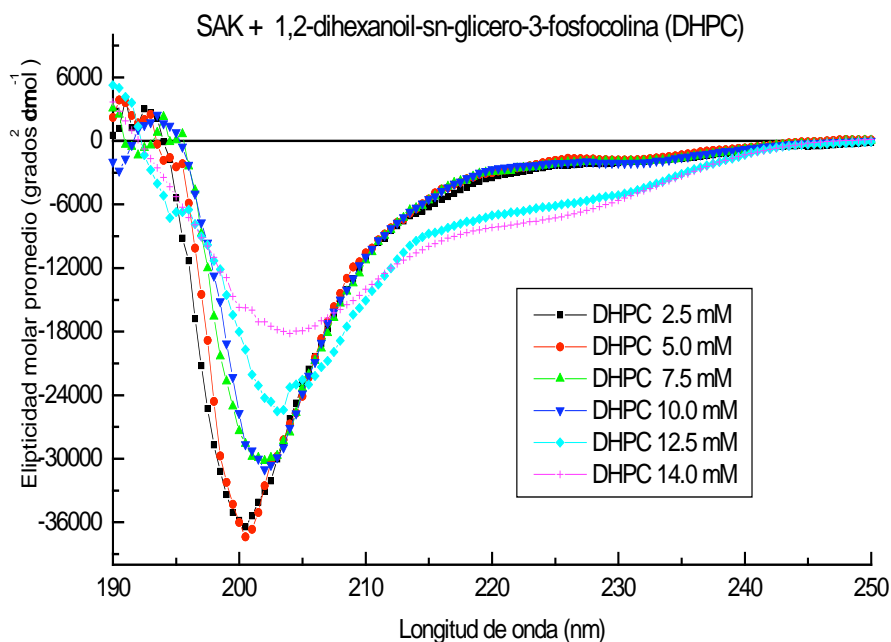
Espectro 12. Efecto de la concentración de PC (0.0025-0.050mM) y colesterol sobre el contenido de hélice α en el péptido SAK.



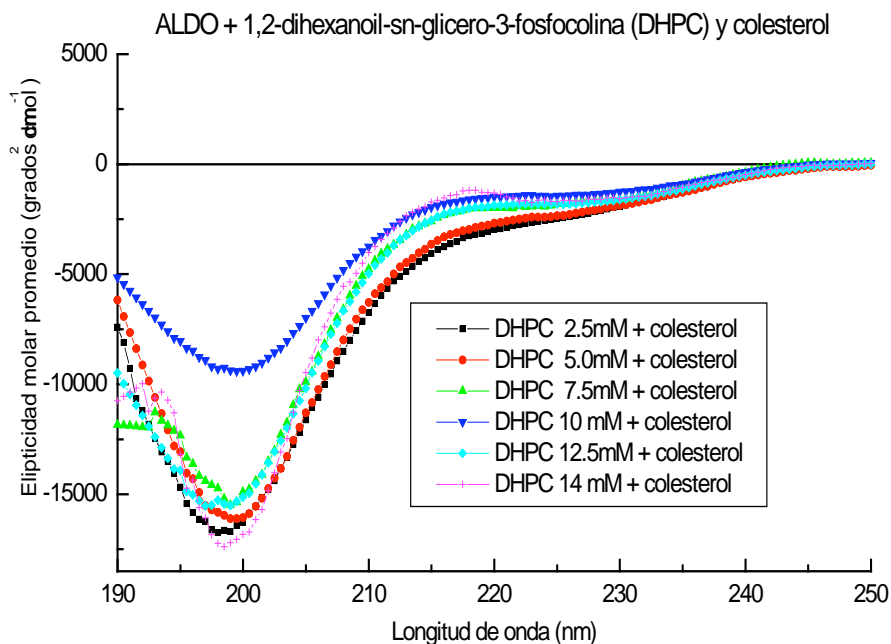
Espectro 13. Efecto de la concentración de DHPC (2.5-14mM) sobre el contenido de hélice α en el péptido ALDO.



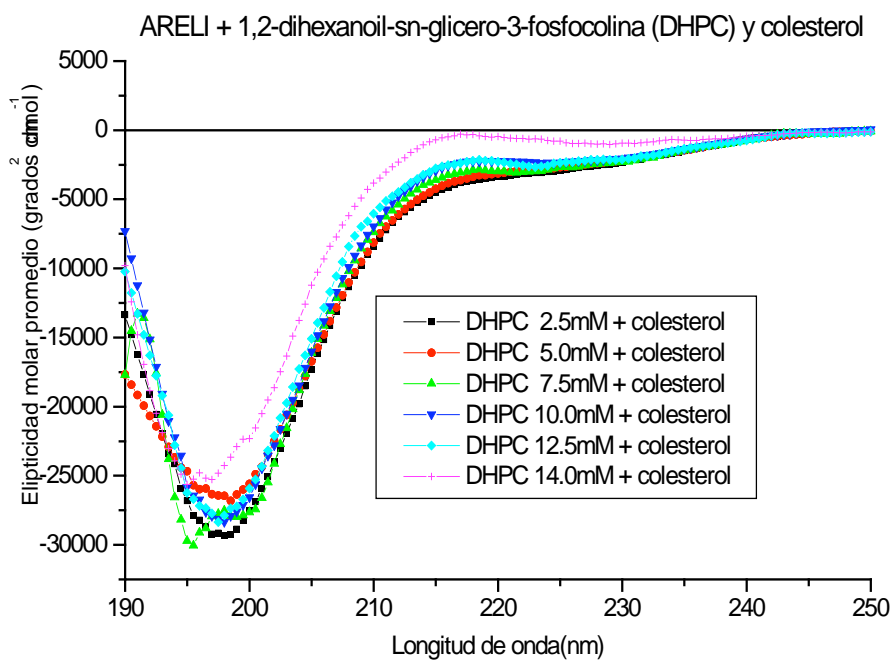
Espectro 14. Efecto de la concentración de DHPC (2.5-14mM) sobre el contenido de hélice α en el péptido ARELI.



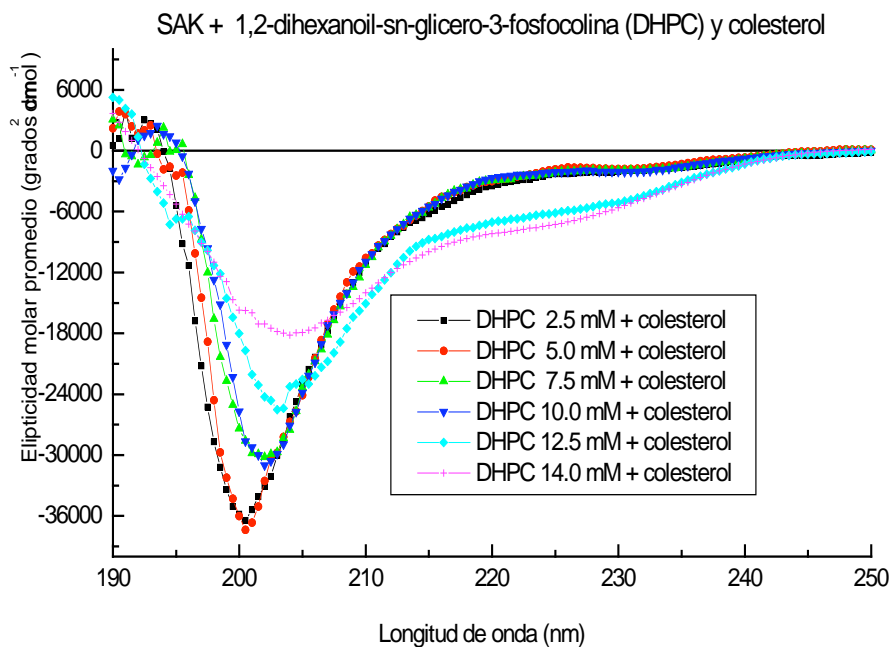
Espectro 15. Efecto de la concentración de DHPC (2.5-14mM) sobre el contenido de hélice α en el péptido SAK.



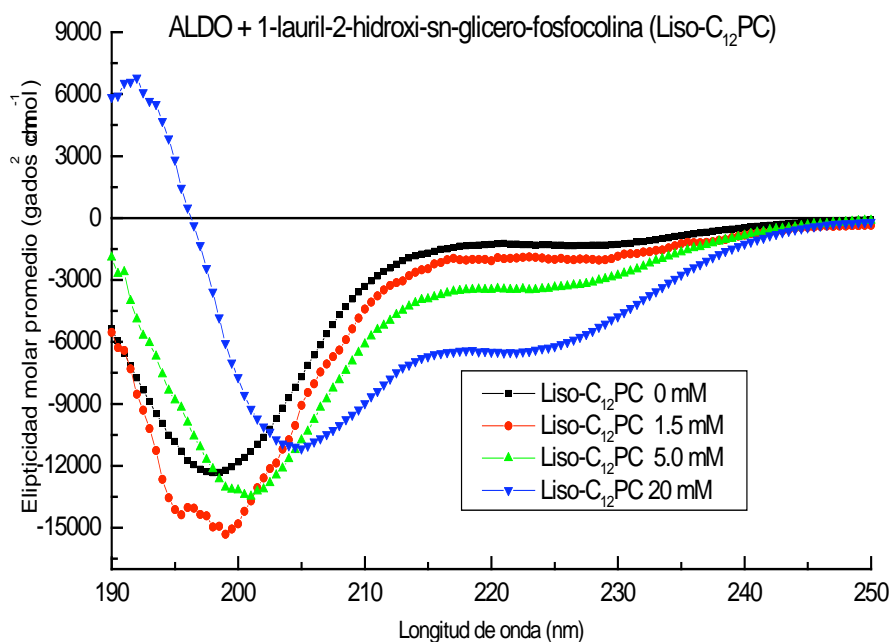
Espectro 16. Efecto de la concentración de DHPC (2.5-14mM) y colesterol sobre el contenido de hélice α en el péptido ALDO.



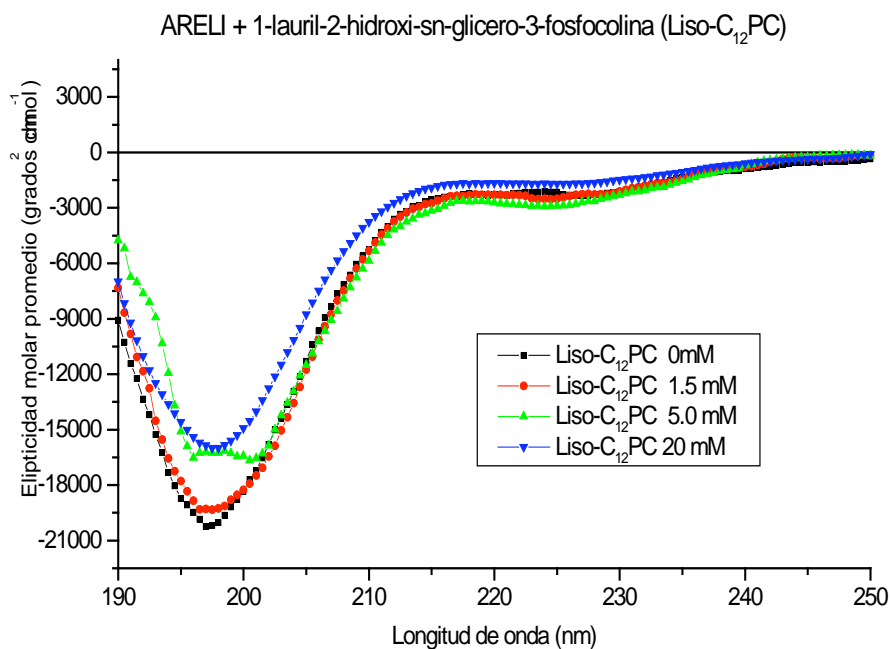
Espectro 17. Efecto de la concentración de DHPC (2.5-14mM) y colesterol sobre el contenido de hélice α en el péptido ARELI.



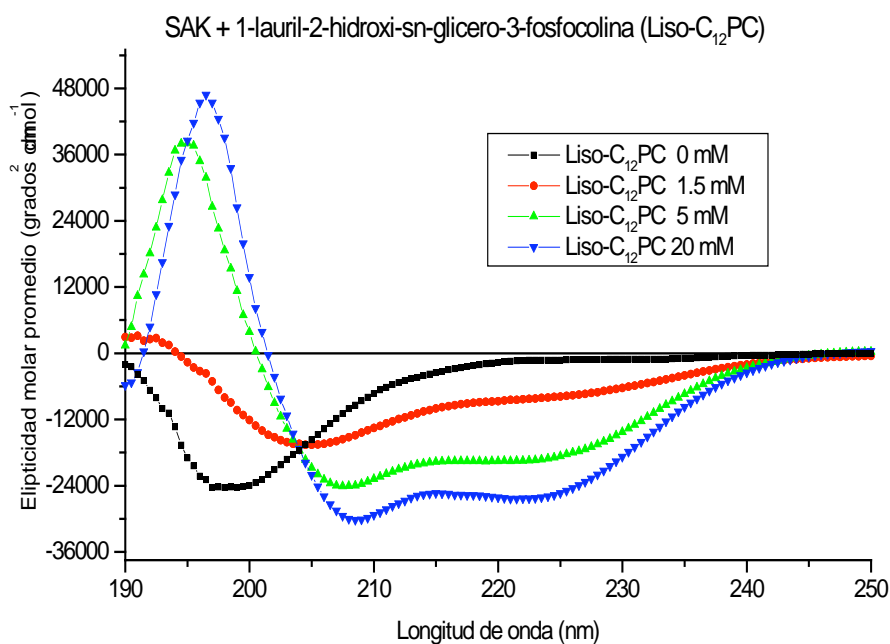
Espectro 18. Efecto de la concentración de DHPC (2.5-14mM) y colesterol sobre el contenido de hélice α en el péptido SAK.



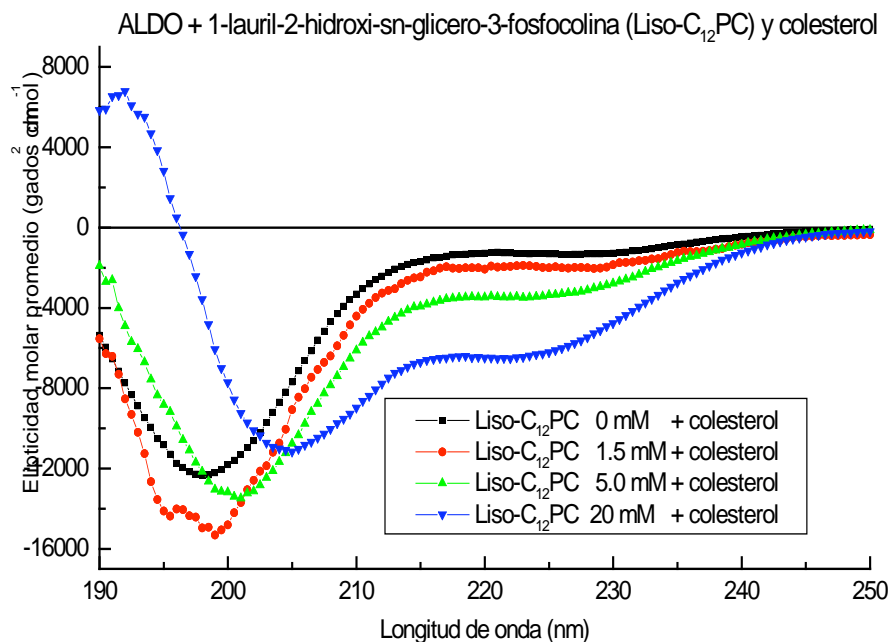
Espectro 19. Efecto de la concentración de Liso-C₁₂PC (0-20mM) sobre el contenido de hélice α en el péptido ALDO.



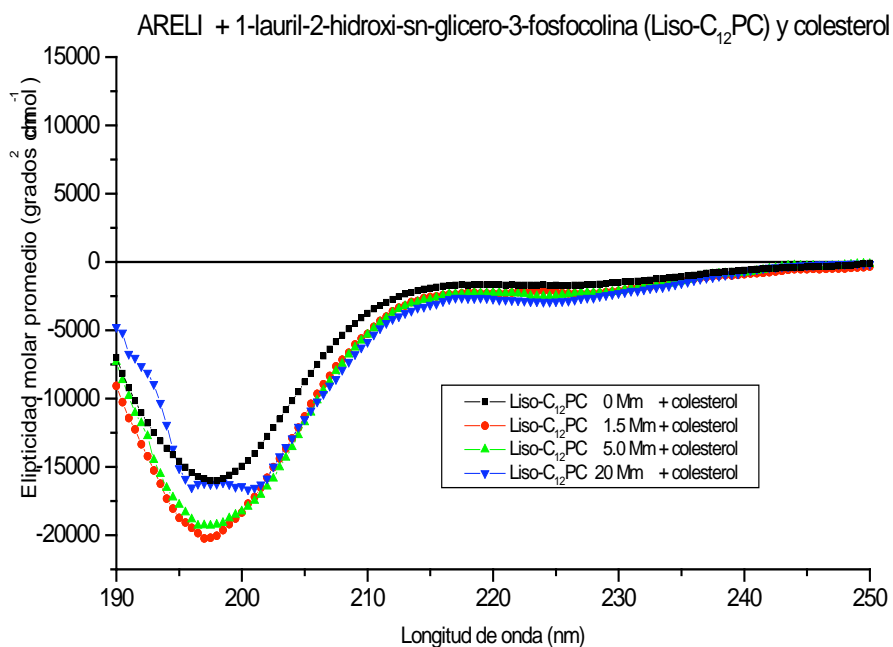
Espectro 20. Efecto de la concentración de Liso-C₁₂PC (0-20mM) sobre el contenido de hélice α en el péptido ARELI.



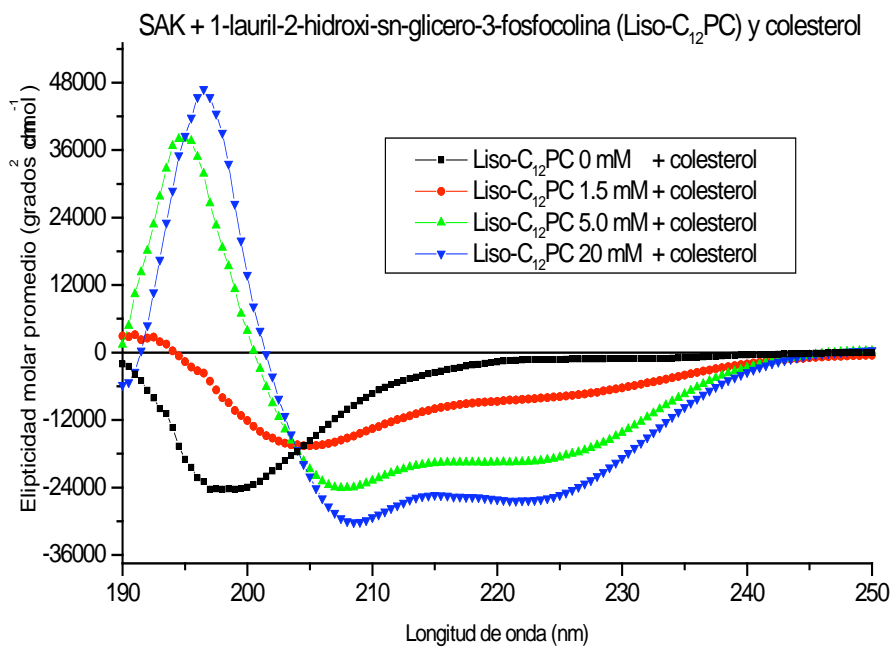
Espectro 21. Efecto de la concentración de Liso-C₁₂PC (0-20mM) sobre el contenido de hélice α en el péptido SAK.



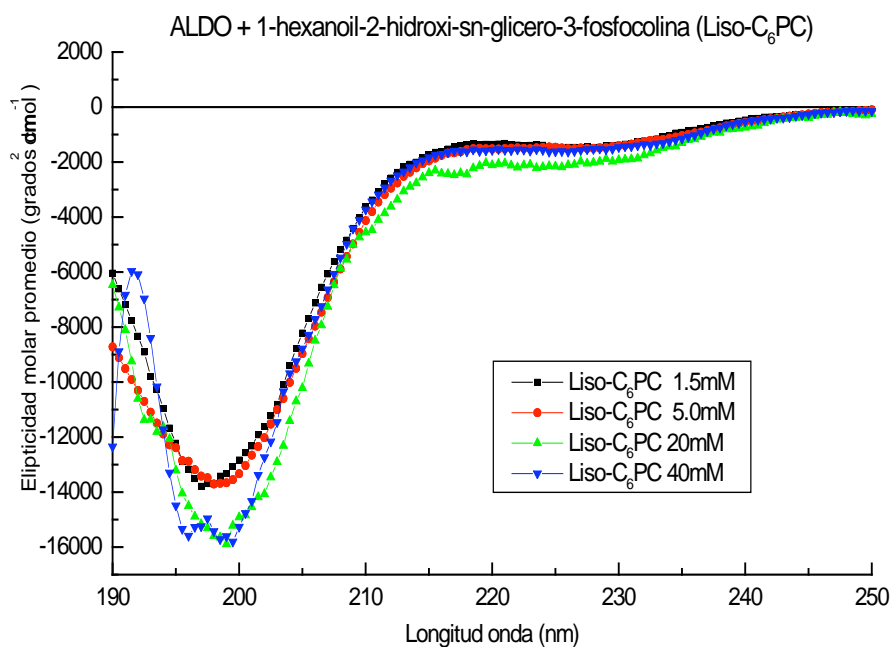
Espectro 22. Efecto de la concentración de Liso-C₁₂PC (0-20mM) y colesterol sobre el contenido de hélice α en el péptido SAK.



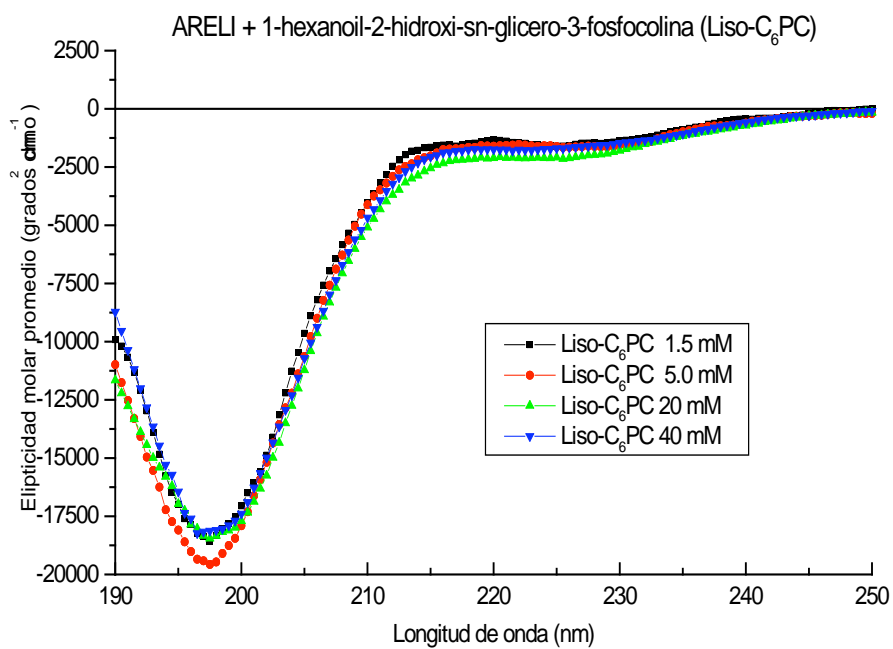
Espectro 23. Efecto de la concentración de Liso-C₁₂PC (0-20mM) y colesterol sobre el contenido de hélice α en el péptido SAK.



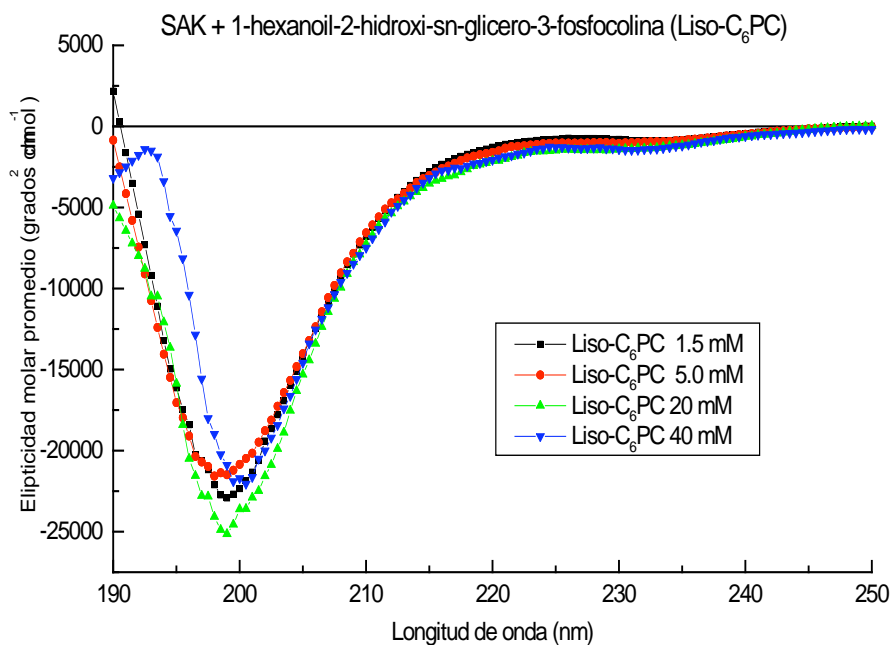
Espectro 24. Efecto de la concentración de Liso-C₁₂PC (0-20mM) y colesterol sobre el contenido de hélice α en el péptido SAK.



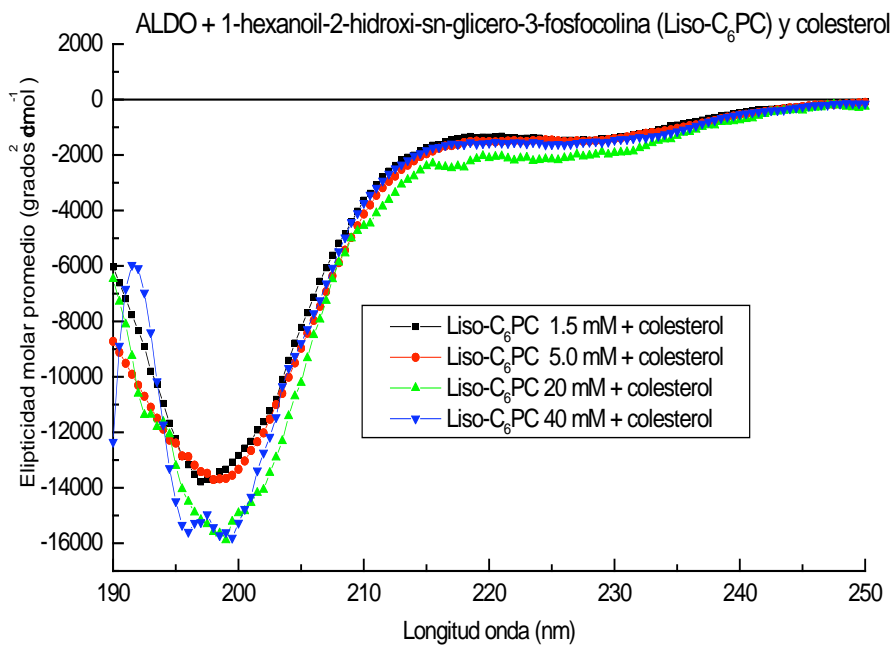
Espectro 25. Efecto de la concentración de Liso-C₆PC (1.5-40mM) sobre el contenido de hélice α en el péptido ALDO.



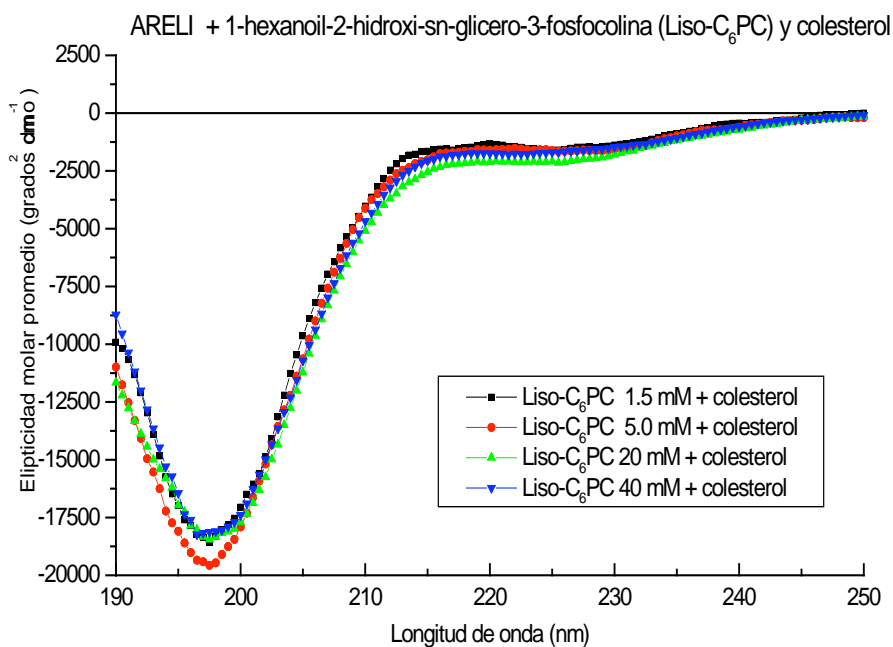
Espectro 26. Efecto de la concentración de Liso-C₆PC (1.5-40mM) sobre el contenido de hélice α en el péptido ARELI.



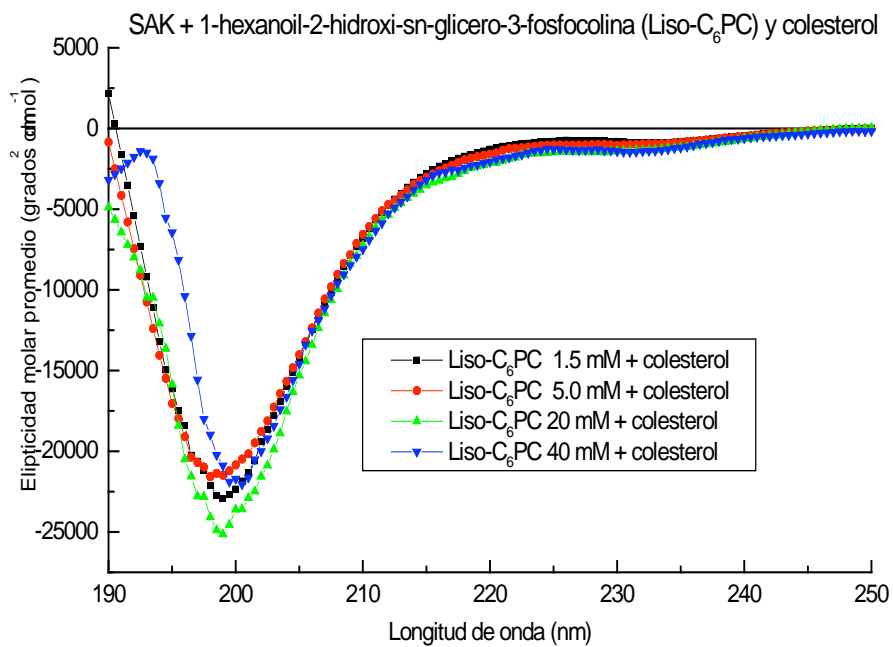
Espectro 27. Efecto de la concentración de Liso-C₆PC (1.5-40mM) sobre el contenido de hélice α en el péptido SAK.



Espectro 28. Efecto de la concentración de Liso-C₆PC (1.5-40mM) y colesterol sobre el contenido de hélice α en el péptido ALDO.



Espectro 29. Efecto de la concentración de Liso-C₆PC (1.5-40mM) y colesterol sobre el contenido de hélice α en el péptido ARELI.



Espectro 30. Efecto de la concentración de Liso-C₆PC (1.5-40mM) y colesterol sobre el contenido de hélice α en el péptido SAK.



9. BIBLIOGRAFIA

1. Albers J. J., Lin J., Roberts G. P. 1979. Effect of human plasma apolipoproteins on the activity of purified lecithin: cholesterol acyltransferase. *Artery*. 5:61-75.
2. Atcliffe B. W., MacRaid C. A., Gooley P.R., Howlett G. J. 2001. The interaction of human apolipoprotein C-1 with sub-micellar phospholipid. *Eur. J. Biochem*. 268:2838-2846.
3. Beattie M. E., Veatch S. L., Stottrup B. L. & Keller S.L. 2005. Sterol structure determines miscibility versus melting transitions in lipid vesicles. *Biophys J*. 89:1760-8.
4. Bolaños G., Ramos S., Castillo R., Xicohtencatl J. & Mas J. 2001. Monolayers of Apolipoproteins at the Air/Water Interface. *J. Phys. Chem*. 105:5757-5765.
5. Bolaños G., Mas O. J., Ramos S & Castillo R. 1999. Phase transitions in monolayers of human apolipoprotein C-I. *J. Phys. Chem. B*. 103:6236–6242.
6. Bolaños G., Soriano G. M. & Mas O. J. 1997. CETP and exchangeable apoproteins: common features in lipid binding activity. *Mol. Cell Biochem*. 175: 1-10.
7. Breslow J.L. 1996. Mouse models of atherosclerosis. *Science*. 72:685–688.
8. Brito R. M. & Vaz W. L. 1986. Determination of the critical micelle concentration of surfactants using the fluorescent probe N-phenyl-1-naphthylamine. *Anal. Biochem*. 152:250-255.



9. Brown W. V. & Baginsky M. L. 1972. Inhibition of lipoprotein lipase by an apoprotein of human very low density lipoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46:375-382.
10. Buck M. 1998. Trifluoroethanol and colleagues: cosolvents come of age. Recent studies with peptides and proteins. *Q. Rev. Biophys.* 31 :297-355.
11. Campos J., Mas O. J. & Castillo R. 2004. Interaction and conformations of α -helical human apolipoprotein C1 on hydrophilic and hydrophobic substrates. *J. Phys. Chem. B.* 108:20442–20450.
12. Curtis W. J. 1990. Protein Secondary Structure and Circular Dichroism: A Practical Guide. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 7:205-214.
13. Despres J. P, Lemieux I, Dagenais, GR, Cantin B. & Lamarche B. 2000. HDL-cholesterol as a marker of coronary heart disease risk: the Quebec cardiovascular study. *Atherosclerosis* 153:263–272.
14. Dolphin P. J. 1984. Lipoprotein metabolism and the role of apolipoproteins as metabolic programmers. *J. Biochem. Cell. Biol.* 63:850-869.
15. Duong C. Q., Bared S. M., Abu-Khader A., Buechler C., Schmitz A. & Schmitz G. 2004. Expression of the lysophospholipid receptor family and investigation of lysophospholipid-mediated responses in human macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* 1682:112-119.
16. Eisenberg D., Wesson M. & Wilcox W. (1989) en Prediction of Protein structure and the principles of protein conformation : Hydrophobic moments as tools for analyzing protein sequences and structures, Fasman G. D., Ed. New York, N.Y., Plenum Press.



-
17. Eisenberg D., Schwarz E., Komaromy M. & Wall R. 1984a. Analysis of Membrane and Surface Protein Sequences with the Hydrophobic Moment Plot. *J. Mol. Biol.* 179: 125-142.
 18. Eisenberg D., Weiss R.M. & Terwilliger T.C. 1984b. The hydrophobic moment detects periodicity in protein hydrophobicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81:140-144.
 19. Eisenberg D., Weiss R.M. & Terwilliger T.C. 1982. The helical hydrophobic moment: a measure of the amphiphilicity of a helix. *Nature* 299:371-374.
 20. Fang Y., Gursky O. & Atkinson D. 2003a. Lipid-binding studies of human apolipoprotein A-I and its terminally truncated mutants. *Biochemistry.* 42:13260-13268.
 21. Fang Y., Gursky O. & Atkinson D. 2003b. Structural studies of N- and C-terminally truncated human apolipoprotein A-I. *Biochemistry.* 42:6881-6890.
 22. Greenfield N. J. 1996. Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data. *Anal. Biochem.* 235:1-10.
 23. Greenfield N. & Fasman G. D. 1969. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry* 8: 4108-4116.
 24. Gursky O. & Atkinson D. 1996. Thermal unfolding of human high-density apolipoprotein A1: implications for a lipid free molten globular state. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:2991-2995.



-
25. Hirota N., Mizuno K. & Goto Y. 1998. Group Additive contributions to the alcohol-induced α -helix formation of melittin: Implication for the mechanism of the alcohol effects on proteins. *J. Mol. Biol.* 275:365-378.
26. Johnson W. C., Jr. (1996) en *Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules : Circular dichroism instrumentation*, Fasman G. D., Ed. New York, N.Y., Plenum Press.
27. Jonas A., Wald J. H., Toohill K. L., Krul E. S. & Kezdy K. E. 1990. Apolipoprotein A-I structure and lipid properties in homogeneous, reconstituted spherical and discoidal high density lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 25: 22123-22129.
28. Kinnunen P. K. & Ehnolm C. 1976. Effect of serum and C-apoproteins from very low density lipoproteins on human postheparin plasma hepatic lipase. *FEBS Letters.* 65: 354-357.
29. Luo P. & Baldwin R. L. 1997. Mechanism of helix induction by trifluoroethanol: A framework for extrapolating the helix-forming properties of peptides from trifluoroethanol/water mixtures back to water. *Biochemistry* 36:8413-8421.
30. MacPhee C. E., Perugini M. A., Sawyer W. H., & Howlett G. J. 1997. Trifluoroethanol induces the self-association of specific amphipathic peptides. *FEBS Letters.* 416: 265-268.
31. Montserret R. McLeish M. J., Böckmann A., Geourjon C. & Penin F. 2000. Involvement of Electrostatic Interactions in the Mechanism of Peptide Folding Induced by Sodium Dodecyl Sulfate Binding. *Biochemistry* 39:8362-8373.



-
32. Morrisett J. D., Jackson R.L., Gotto Jr. A. M. 1976. Lipid-Protein interactions in the plasma lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta*: 94-133.
 33. Negre-Salvayre A., Dousset N., Ferretti G., Bacchetti T., Curatola G. & Salvayre R. 2006. Antioxidant and cytoprotective properties of high-density lipoproteins in vascular cells. *Free. Radic. Biol. Med.* 41:1031-1040.
 34. New R. R. (1990), en *Liposomes: Preparation of Liposomes*, New R. R., Ed. New York, N.Y., Oxford University Press.
 35. Plutzky J. 2000. Emerging concepts in metabolic abnormalities associated with coronary artery disease. *Curr. Opin. Cardiol.* 15:416–421.
 36. Reiersen H. & Rees A. R. 2000. Trifluoroethanol may form a solvent matrix for assisted hydrophobic interactions between peptide side chains. *Protein Eng.* 11: 739-743.
 37. Rozek A., Buchko G. W., & Cushley R. J. 1995. Conformation of two peptides corresponding to human apolipoprotein C-I residues 7-24 and 35-53 in presence of sodium dodecyl sulfate by CD and NMR spectroscopy. *Biochemistry* 34:7401-7408.
 38. Rozek A., Buchko G. W., Kanda P., Cushley R. J. 1997. Conformational studies of the N-terminal lipid-associating domain of human apolipoprotein C-I by CD and H NMR spectroscopy. *Protein Science.* 6:1858-1868.
 39. Rozek A., Sparrow S.T., Weisgraber K.H. & Cushley R.J. 1999. Conformation of Human Apolipoprotein C-I in a Lipid-Mimetic Environment Determined by CD and NMR Spectroscopy. *Biochemistry.* 38:14475-14484.



-
40. Ruíz G. J., Moreno A., Brezesinski G., Möhwald H, Mas O. J. & Castillo R. 2003. Phase transitions and conformational changes in monolayers of human apolipoproteins CI and AII. *J. Phys. Chem. B.* 107:11117–11124.
41. Sabin J., Prieto G., Ruso J.M., Hidalgo-Alvarez R. & Sarmiento F. 2006. Size and stability of liposomes: a possible role of hydration and osmotic forces. *Eur. Phys. J E Soft Matter.* 20:401-408.
42. Segrest J. P., Jones M. K., De Loof H., Brouillette C.G., Venkatachalapathi Y. V. & Anantharamaiah G. M. 1992. The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function. *J. Lipid Res.* 33, 141-66.
43. Segrest J. P, Loof H., Dohlman J.G., Brouillette C.G., & Anantharamaiah G.M. 1990. Amphipathic Helix Motif: Classes and Properties. *Proteins* 8:103-117.
44. Sehayek E. & Eisenberg S. 1991. 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.* 266:18259-18267.
45. Stein O. & Stein Y. 1999. Atheroprotective mechanisms of HDL, *Atherosclerosis.* 44:285–301.
46. Sviridov D., Nestel P. & Watts G. 2007. Statins and metabolism of high density lipoprotein. *Cardiovasc. Hematol Agents Med. Chem.* 5:215-221.
47. Swaney J. B. & Weisgraber K. H. 1994. 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.* 35:134-142.



-
48. Torkhovskaya T.I., Ipatova O.M., Zakharova T.S., Kochetova M.M. & Khalilov E.M. 2007 Lysophospholipid receptors in cell signaling. *Biochemistry*. 72 :125-31.
49. Tournier J. F., Bayard F. & Tauber J. P. 1984. Rapid purification and activity of apolipoprotein CI on the proliferation of bovine vascular endothelial cells in vitro. *Biochim. Biophys. Acta*. 804:216-220.
50. Weisgraber K. H., Mahley R. W., Kowal R.C., Herz J., Goldstein J. L., Brown M. S. 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.
51. Weisgraber K. H., Newhouse Y. M. & McPherson A. 1994. Crystallization and preliminary X-ray analysis of human plasma apolipoprotein E distribution among human plasma lipoproteins: role of the cysteine-arginine interchange at residue 112. *J. Lipid Res*. 31:1503-1511.
52. Wieprecht T, Beyermann M & Seelig J. 2002. Thermodynamics of the coil-alpha-helix transition of amphipathic peptides in a membrane environment: the role of vesicle curvature. *Biophys Chem*. 96:191-201.
53. Woody R. W. (1996) en *Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules : Theory of Circular Dichroism of Proteins*, Fasman G. D., Ed. New York, N.Y., Plenum Press.
54. Wu C.S. & Yang J. T. 1990. Thermal unfolding of helices of a C-peptide analogue of ribonuclease A in sodium dodecyl sulfate solution. *Biopolymers* 30:381-388.



-
55. Xicohtencatl J., Castillo R. & Mas O. J. 2004. In search of new structural states of exchangeable apolipoproteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 24:467-470.
56. Young J. K., Mari F., Xu M., Humphreys R. E., Clemente N. M., Stattel J.M., Nelson D. J., Gambino J. & Wright G.E. 1997 Structural studies by ¹H NMR of a prototypic alpha-helical peptide (LYQELQKLTQTLK) and homologs in trifluoroethanol/water and on sodium dodecyl sulfate micelles. *J. Pept. Res.* 50:122-131.