



## **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

Doctorado en Ciencias Biomédicas

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR  
UNAM

Relación Estructura/Función  
de Apolipoproteínas Plasmáticas

### **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:  
Q.F.B PAOLA MENDOZA ESPINOSA

TUTOR:  
DR. JAIME MAS OLIVA  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

COMITÉ TUTOR:  
DR. ABEL MORENO, INSTITUTO DE QUÍMICA  
DR. ROLANDO CASTILLO, INSTITUTO DE FÍSICA

MÉXICO, D. F., NOVIEMBRE 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



*A mis padres*

*Olga Espinosa Franco y José Luis Mendoza Ruíz*

*por todo su amor, comprensión*

*y apoyo incondicional.....*

## Agradecimientos

A los miembros de mi comité tutorial por su guía y consejos para el desarrollo de este trabajo de tesis doctoral:

Al Dr. Jaime Mas Oliva del Instituto de Fisiología Celular por brindarme su apoyo y la oportunidad para desarrollar este proyecto de doctorado en su laboratorio. El Dr. Mas Oliva sin lugar a dudas es un tutor inigualable, en su laboratorio aprendí que los límites están en uno mismo y que el deseo de superación es el principal ingrediente del éxito. Le agradezco también las anécdotas y consejos que definitivamente enriquecieron mi formación.

Al Dr. Abel Moreno del Instituto de Química, por toda su disposición para realizar varios experimentos en su laboratorio, lo cual fue un apoyo invaluable.

Al Dr. Rolando Castillo del Instituto de Física, por su constante disposición para llevar a cabo varios experimentos. Sobre todo, agradezco el curso de posgrado que nos brindó para reforzar conceptos de fisicoquímica.

A los miembros del comité revisor por sus comentarios sumamente valiosos para mejorar el contenido de este trabajo de tesis doctoral:

Presidente:	Dra. Alicia Ortega Aguilar	Facultad de Medicina
Secretario:	Dra. Soledad Funes Argüello	Instituto de Fisiología Celular
Vocal:	Dra. Adela Rodríguez Romero	Instituto de Química
Vocal:	Dr. Héctor Riveros Rosas	Facultad de Medicina
Vocal:	Dr. Oscar Armando Pérez Méndez	Instituto Nacional de Cardiología

Al Dr. Juan Pablo Reyes Grajeda por su colaboración en el diseño de los primeros experimentos que realicé en el doctorado.

Al Dr. Ángel Piñeiro y la Dra. Pilar Brocos de la Facultad de Física en Santiago de Compostela (España), por la oportunidad de realizar una estancia de investigación en su laboratorio.

A la M. en C. Blanca Delgado Coello por su excelente asistencia técnica y colaboración en el laboratorio, así como su asesoría en el desarrollo de métodos experimentales.

A la Unidad de Imagenología del Instituto de Fisiología Celular, UNAM y especialmente al M.C. Rodolfo Paredes por el apoyo técnico en el procesamiento de las muestras de Microscopía Electrónica de Transmisión.

Al servicio de Biblioteca del Instituto de Fisiología Celular, UNAM y especialmente a la M. en B. Sandra Guillermina Moncada Hernández por todas sus atenciones.

A la Unidad de Servicio de Cómputo del Instituto de Fisiología Celular, UNAM por los servicios y apoyo técnico prestado durante el desarrollo de este trabajo, especialmente al Biól. Gerardo Coello Coutiño, Ing. Juan Manuel Barbosa Castillo e Ing. Ivett Rosas Arciniega.

Al Ing. José Luis Mendoza Espinosa por su apoyo y asesoría en la implementación de programas y sistemas operativos para el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Danaí Montalvan Sorrosa por su amistad y el plus de haber trabajado juntas en el laboratorio. Es una persona excepcional en todos los sentidos y me hace feliz el poder contarla entre mis amistades.

Al Dr. Salvador Damián Zamacona, es una de las personas con mayor disposición que yo haya conocido para resolver problemas de cualquier índole. Agradezco esa inmensa oreja que me prestó para escuchar mis dudas sobre el trabajo del laboratorio y hasta las de tipo personal.

Al M. en C. Luis Pablo Ávila y nuestra próxima Dra. Paola Toledo Ibelles por su amistad y alegres momentos compartidos en el laboratorio.

A mi madre, por toda esa energía que me contagia, ese amor que me inyecta cada día. Gracias por los consejos, los gritos de alerta y nuestra feliz convivencia. Me siento muy orgullosa de tí y hoy puedo corresponder un poco a toda esa inversión de vida que has hecho en mí.

A mi padre, por enseñarme el tesoro que es tener paciencia y alentarme a perseguir mis sueños. Agradezco todo el apoyo y amor que me ha brindado.

A mis hermanos Olga, José y Adolfo, por todos los momentos felices compartidos. Me siento afortunada porque son unos seres humanos excepcionales con los que siempre puedo contar en las buenas y en las malas.

A mis abuelos Josefina Ruíz y Miguel Mendoza, por llenarme de amor, por enseñarme a valorar las cosas importantes de la vida y ser un ejemplo para mí.

A mi amiga Laura Leal, se supone que son tres mosqueteros pero nosotras siempre hemos sido dos en las aventuras, su fantástica personalidad hace que eso ya sea multitud....

A mi amiga Natalia Manzano, por la amistad de todos estos años y compartir también los momentos familiares.

A mi amigo José Cuaxospa, por compartir experiencias, logros, sueños, cuentos y poemas conmigo....Siempre hace que los problemas serios de la vida parezcan "detalles técnicos", así como les dice.

Este trabajo fue financiado por CONACyT (180726) y DGAPA-UNAM (RR205711). Además se otorgó una beca de doctorado por CONACyT para estudios de posgrado de tiempo completo.

## ABREVIATURAS

$\mu$ H	Momento hidrofóbico	MFA	Microscopía de fuerza atómica
ABCA1	Proteína transportadora de unión a ATP tipo 1 ( <i>ATP-binding cassette transporter</i> )	PC	L- $\alpha$ -fosfatidilcolina
Apo	Apolipoproteína	pl	Punto isoeléctrico
CETP	Proteína transferidora de éster de colesterol ( <i>cholesterol ester transfer protein</i> )	PLTP	Proteína transferidora de fosfolípidos ( <i>phospholipid transfer protein</i> )
CMC	Concentración micelar crítica	PONDR	Predictor of Natural Disordered Regions
DC	Dicroísmo circular	PPC	1-palmitoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina
DHPC	1-2-dihexanoil-sn-glicero-3-fosfocolina	Qm	Quilomicrones
DLS	Dispersión dinámica de luz ( <i>dynamic light scattering</i> )	RMN	Resonancia magnética nuclear
DMPC	1,2-dimiristoil fosfatidilcolina	RPE	Resonancia paramagnética electrónica
HCA	<i>Hydrophobic cluster analysis</i>	SDS	Dodecil sulfato de sodio ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
HDL	Lipoproteína de alta densidad ( <i>high density lipoprotein</i> )	SRB1	Receptor pepenador (scavenger receptor class B type 1)
IDL	Lipoproteína de densidad intermedia ( <i>intermedia density lipoprotein</i> )	TFE	2,2,2-trifluoroetanol
LCAT	Lecitina colesterol aciltransferasa ( <i>lecithin-cholesterol acyltransferase</i> )	TRC	Transporte reverso del colesterol ( <i>reverse transport of cholesterol</i> )
LDL	Lipoproteína de baja densidad ( <i>low density lipoprotein</i> )	UV	Luz ultravioleta
LH	Lipasa hepática ( <i>lipase hepatic</i> )	VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad ( <i>very low density lipoprotein</i> )
Liso-C <sub>6</sub> PC	1-hexanoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina		
Liso-C <sub>12</sub> PC	1-lauril-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina		
LPL	Lipasa lipoprotéica ( <i>lipoprotein lipase</i> )		
LRP	Proteína relacionada a receptor de LDL ( <i>LDL-receptor-related protein</i> )		
LPC	1-lauoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina		
MET	Microscopía electrónica de transmisión		

# Índice

Contenido de la tesis	1
Resumen	4
Abstract	5
Antecedentes	6
Capítulo 1: Introducción	8
Capítulo 2: Estudio de las transiciones desorden-orden en péptidos derivados de ApoC-I	38
Capítulo 3: Modulación de la actividad enzimática de LCAT por péptidos derivados de ApoA-I	56
Capítulo 4: Experimentos <i>in silico</i> del C-terminal de CETP y de formación de micelas	66
Capítulo 5: Enfermedad asociada a la conformación de proteínas	88
Capítulo 6: Estructura, función y propensión amiloidogénica de la apolipoproteína A-I	110
Capítulo 7: Efecto del microambiente en la conformación de péptidos derivados de ApoA-I	124
Capítulo 8: Discusión y Perspectivas	146
Lista de publicaciones	153
Lista de participación en congresos	154
Apéndice I	156

## Contenido de la tesis

Este trabajo está organizado de la siguiente manera: Se presenta un resumen de la tesis en español e inglés, los antecedentes directos de esta línea de investigación, una introducción y seis capítulos en donde se exponen los trabajos publicados. Cada capítulo consta de resumen, introducción, resultados, discusión, métodos y bibliografía. Por último, un capítulo con una discusión general y perspectivas. En esta tesis también se incluyen datos no publicados que enriquecen la exposición del tema en cada capítulo.

El enfoque general de la tesis es estudiar como las transiciones de tipo desorden-orden modulan la función de proteínas involucradas en el transporte de lípido. Específicamente estudiamos como la inducción de cambios a nivel de estructura secundaria en péptidos derivados de las apolipoproteínas C-I y A-I, llevados a cabo por moléculas lipídicas específicas, podría correlacionarse con su contexto fisiológico sobre la superficie de lipoproteínas.

*En el capítulo 1*, se da una introducción sobre las características estructurales y fisiológicas de las apolipoproteínas ApoC-I y ApoA-I que sirvieron como modelo de estudio en este trabajo. Brevemente se describe la gran importancia de herramientas como la cristalografía y el modelado molecular en estudios de estructura/función de proteínas. Así mismo, se comenta la correlación que existe entre los cambios conformacionales de tipo desorden-orden en proteínas y el desarrollo de enfermedad.

*En el capítulo 2*, estudiamos las transiciones desorden-orden de péptidos derivados de ApoC-I en presencia de lípido y otras moléculas que también generan cambios en su estructura secundaria. Con estos experimentos pudimos emular el microambiente presente en la superficie de la HDL. De esta manera, los resultados que obtuvimos

fueron clave para proponer un mecanismo por el cual esta proteína podría estar llevando a cabo su función como activador de la enzima LCAT.

*En el capítulo 3*, analizamos el efecto de las transiciones desorden-orden de péptidos derivados de ApoA-I en la activación de la enzima LCAT. Con estos experimentos proponemos un mecanismo mediante el cual esta proteína interactúa con diferentes receptores y enzimas a través de sitios que probablemente son clave en su función.

*En el capítulo 4*, como un siguiente paso en la caracterización a nivel atómico de las interacciones péptido-lípido se planteó el desarrollo de dinámicas moleculares con el segmento C-terminal de CETP y por otro lado se desarrolló una metodología para generar micelas lipídicas. Estos experimentos *in silico* confirmaron que un segmento clave del C-terminal de CETP tiene la capacidad de generar micelas y de esta forma posiblemente podría transportar lípidos entre lipoproteínas.

*En el capítulo 5*, se realizó una revisión sobre como las transiciones desorden-orden en diferentes proteínas pueden generar enfermedad. En este trabajo se trata de forma concreta los diferentes aspectos tanto termodinámicos como fisiológicos de varias proteínas involucradas en procesos de amiloidosis.

*En el capítulo 6*, se realizó una revisión sobre las transiciones desorden-orden específicamente en ApoA-I que podrían estar generando enfermedad y se propuso un mecanismo por el cual se generan *in vivo* fibras amiloides de segmentos de ApoA-I.

*En el capítulo 7*, se expone como trabajo final el estudio de las transiciones desorden-orden en los péptidos derivados de ApoA-I estudiados en el capítulo 3 pero con un enfoque asociado a procesos de plegamiento anómalo. En este caso, observamos que los mismos segmentos involucrados en detonar las funciones de la ApoA-I también están involucrados en los procesos patológicos como son la formación de fenómenos amiloidóticos.

*En el capítulo 8, se expone por último una discusión general de estos trabajos y se describen las perspectivas generadas para continuar esta línea de investigación.*

## Resumen

En este trabajo como estrategia experimental para estudiar a la ApoA-I y ApoC-I se diseñaron varios péptidos derivados de sus secuencias tomando en cuenta propiedades físico-químicas, así como datos teóricos que mostraron que estos segmentos son sitios relevantes de interacción con otras apolipoproteínas y sus receptores. Estos péptidos fueron estudiados *in silico* y mediante las técnicas de dicroísmo circular, DLS y microscopía electrónica en presencia de diferentes moléculas. Con estos experimentos demostramos que péptidos derivados de la ApoA-I y ApoC-I poseen una flexibilidad estructural en estrecha relación con el microambiente que les rodea. Nosotros estudiamos su comportamiento en un ambiente mimético a la superficie de la HDL. En consecuencia, se propuso un mecanismo para la función de ApoC-I unida a la partícula HDL. Así mismo, se sugiere un mecanismo para la interacción de ApoA-I con enzimas y receptores relacionados con el transporte reverso de colesterol. En este trabajo también se observó que al menos dos péptidos derivados de la ApoA-I parecen ser relevantes para la nucleación y la agregación de esta proteína. En conjunto, estos datos ponen en relieve un papel clave desempeñado por las transiciones desorden-orden en condiciones fisiológicas así como en procesos patológicos como por ejemplo la enfermedad de Alzheimer y la aterosclerosis para las cuales aún no se han encontrado terapias efectivas.

## Abstract

In this study we used as experimental tools several ApoA-I and CI-derived peptides designed taking into consideration physicochemical properties as well as theoretical data. These peptides show relevant sites for interaction with other apolipoproteins and their receptors. These peptides were analyzed *in silico* and experimentally by circular dichroism, DLS and electronic microscopy techniques employing different solvents. We found that ApoA-I and CI-derived peptides showed a structural flexibility closely related to its surrounding microenvironment, similar to the one found in the surface of HDL. Therefore, a mechanism explaining the function of Apo C-I bound to its HDL particle is proposed. In addition, a mechanism for the interaction of ApoA-I with enzymes and receptors to promote reverse cholesterol transport is suggested. At least two peptides derived from ApoA-I seem to be relevant for nucleation and aggregation of this protein. Together, this data emphasize a key role played by disorder to order structural transitions not only under physiological conditions but importantly, during several pathological processes such as the ones found in Alzheimer disease and atherosclerosis where successful therapies have not been yet found.

## Antecedentes

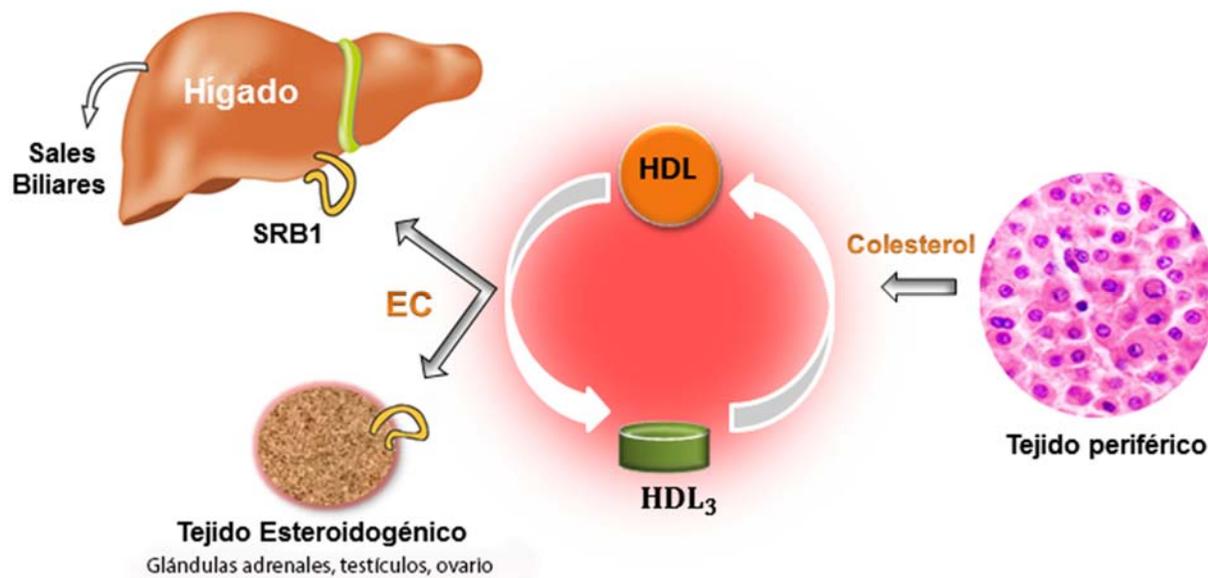
En el laboratorio existe un gran interés por definir cuáles son las características estructurales claves que permiten que las apolipoproteínas plasmáticas (Apos) realicen funciones básicas como el reconocimiento del receptor, la actividad de transferencia de lípidos y la auto-intercambiabilidad entre diferentes lipoproteínas llevada a cabo por varias de estas proteínas. Nuestro grupo ha tratado de abordar estos puntos midiendo directamente cambios conformacionales en la estructura secundaria de Apos en las interfases aire/agua y lípido/agua, (Xicohtencatl-Cortés et al., 2004a, 2004b). Esto se ha logrado empleando monocapas de Langmuir en combinación con microscopía de ángulo de Brewster (BAM), microscopía de fuerza atómica (AFM) de películas Langmuir-Blodgett de Apos (Bolaños-García et al, 1999, 2001;. Mas-Oliva et al, 2003;. Xicohtencatl-Cortés et al, 2004a), difracción de rayos X de ángulo rasante (Ruiz-García et al., 2003), y las mediciones de fuerza de superficie (Campos-Terán et al, 2004; Ramos et al, 2008). Sin embargo, en ese momento no fue posible definir si la estructura secundaria de segmentos específicos de la apolipoproteína C-I (Apo C-I) y A-II (Apo A-II) se mantenían estables dependiendo de su posición en las interfases aire/agua y lípido/agua. En este trabajo abordamos la posibilidad de que segmentos específicos en las proteínas ApoA-I y ApoC-I sensibles a cambios ambientales siguiendo transiciones desorden-orden podrían funcionar como interruptores moleculares y de esta forma disparar su actividad fisiológica.



## Introducción

## La apolipoproteína A-I y el transporte reverso de colesterol

Es bien conocido que la lipoproteína de alta densidad (HDL del inglés *high density lipoprotein*) protege contra riesgos de enfermedades cardiovasculares y aterosclerosis. Entre las proteínas intercambiables la apolipoproteína A-I (ApoA-I) es la proteína principal que compone a las HDL y en conjunto con esta partícula acarrea el exceso de colesterol de tejidos periféricos al hígado en un proceso denominado transporte reverso de colesterol (TRC) (Fig.1). En el primer paso del TRC, la proteína transportadora que une a ATP tipo 1 (ABCA1 del inglés *ATP-binding cassette transporter*) y la ApoA-I pobre en lípido, interaccionan mediante un mecanismo que actualmente no está completamente descrito. Se genera una partícula denominada pre $\beta$ -1HDL que tiene forma discoidal y que contiene fosfolípidos así como poco colesterol. La partícula pre $\beta$ -1HDL es un aceptor altamente efectivo del colesterol sin esterificar que se encuentra en las membranas celulares. Durante el segundo paso, la partícula HDL discoidal funciona como un sustrato para la enzima lecitina colesterol acil transferasa (LCAT del inglés *lecithin-cholesterol acyltransferase*) la cual es activada por ApoA-I. En este paso la enzima LCAT convierte moléculas de colesterol y fosfatidilcolina a éster de colesterol y lisofosfatidilcolina. La remoción de colesterol de la superficie de estos complejos discoidales promueve un importante cambio morfológico: la transformación de una partícula discoidal a una esférica. La conformación esférica de HDL se transporta por el torrente sanguíneo y es reconocida por el hígado mediante el receptor pepenador clase B tipo 1 (SRB1 del inglés *scavenger receptor class B type 1*). La interacción HDL-esférica/SRB1 permite que el colesterol sea internalizado al hígado y posteriormente sea excretado como bilis, además genera la remodelación de las lipoproteínas así como la regeneración de la ApoA-I pobre de lípido [1].



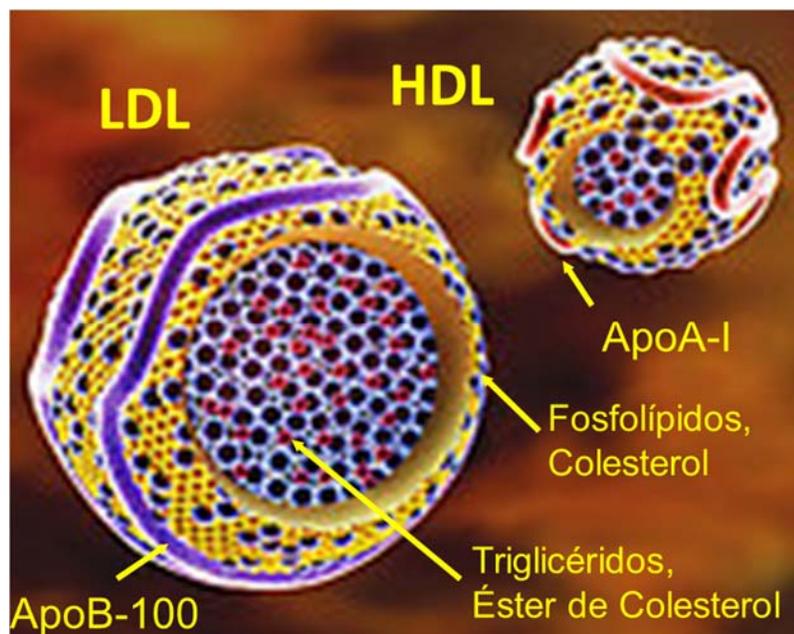
**Fig. 1.** Proceso del Transporte Reverso de Colesterol. La ApoA-I pobre en lípido es secretada por el hígado, posteriormente interacciona con la proteína ABCA1 que se encuentra en este mismo tejido y le provee de más fosfolípidos y muy poco colesterol generando la HDL discoideal. La HDL discoideal capta colesterol libre de la superficie de tejidos y mediante la acción de LCAT este es transformado a éster de colesterol (EC) el cual difunde al interior de la partícula formando la HDL esférica. La HDL esférica interacciona con el receptor SRB1 de células hepáticas y tejido esteroidogénico para que el EC sea desechado como bilis o se produzcan hormonas respectivamente. Modificado de Krieger M. (2001) [2].

El mecanismo por el cual la ApoA-I activa a LCAT actualmente se encuentra bajo una intensa investigación. Sin embargo, un trabajo de nuestro laboratorio ha identificado *in vitro* que los dominios terminales de ApoA-I promueven la actividad de esta enzima [3]. La remodelación de las partículas HDL discoideales también es modulada por otras enzimas plasmáticas y proteínas transferidoras de lípido, tales como la proteína transferidora de éster de colesterol (CETP del inglés *cholesterol ester transfer protein*)

y la proteína transferidora de lípidos (PLTP del inglés *phospholipid transfer protein*). La proteína CETP cataliza la transferencia de exceso de éster de colesterol de la HDL a lipoproteínas de baja densidad (LDL del inglés *low density lipoprotein*) y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL del inglés *very low density lipoprotein*). Así mismo, la proteína PLTP promueve la transferencia de exceso de fosfolípidos de HDL a VLDL y la conversión de HDL en partículas más pequeñas o más grandes. La proteína LCAT es una enzima clave en el mantenimiento de la homeostasis de colesterol y regulación del transporte de colesterol en el torrente sanguíneo. En los casos en los que existe una deficiencia de la proteína LCAT se presenta una acumulación de colesterol y éster de colesterol en tejidos. La HDL esférica juega un papel clave en el transporte de colesterol de los tejidos periféricos al hígado y el tamaño de los complejos esféricos es determinado principalmente por el número de moléculas de apolipoproteína A-I y A-II por partícula. Las partículas esféricas HDL que contienen de dos a tres moléculas de ApoA-I pero no ApoA-II presentan un diámetro de Stokes de 8.5 y 10.8 nm respectivamente. El complejo HDL esférico también puede ser reconstituido *in vitro* principalmente mediante técnicas de ultrasonificación.

Para dilucidar la estructura y dinámica de la ApoA-I en su forma libre de lípido en solución, así como en su forma unida a lípido en complejo con la HDL discoidal o esférica se han desarrollado distintos enfoques metodológicos. Los modelos de HDL esférica proponen que las apolipoproteínas comparten la superficie de estas partículas en conjunto con las cabezas polares de los fosfolípidos, mientras que los ésteres de colesterol y triglicéridos constituyen el centro hidrofóbico de estas partículas (Fig. 2). En la HDL esférica, las hélices- $\alpha$  anfipáticas de la ApoA-I probablemente interactúan con las cadenas acílicas de los lípidos. Esta visión estructural de la HDL es similar a la propuesta para otras lipoproteínas en su conformación esférica. Sparks y col. (1992)

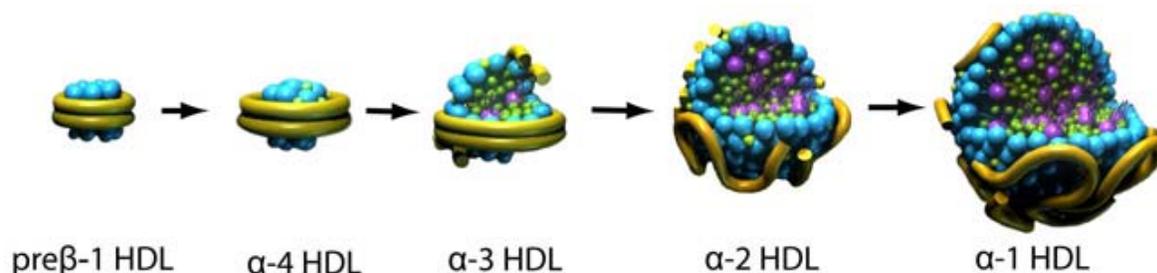
mostraron que la estructura y estabilidad de ApoA-I en la HDL dependen del tamaño de la partícula discoidal pero no de la esférica [4]. Este grupo encontró que existe una diferencia en la carga superficial de la proteína dependiendo de su estado como partícula discoidal o esférica y con estudios de resonancia magnética nuclear (RMN) observaron que la conformación de ApoA-I es sensible a cambios de la forma y tamaño de la HDL [4].



**Fig. 2.** Estructura de las lipoproteínas. Caricatura de las lipoproteínas HDL y LDL indicando la presencia de una monocapa de fosfolípidos y colesterol con un centro formado por triglicéridos y éster de colesterol. Modificado de *Hybrid Medical Animation* [5].

Actualmente las técnicas de resonancia de plasmón superficial y resonancia paramagnética electrónica (RPE) confirman una alta plasticidad en la estructura secundaria de la ApoA-I durante las transiciones de discoidal a esférica (Fig. 3) [6-8]. Estos estudios también soportan las conclusiones obtenidas a partir de la estructura

cristalina de la molécula truncada [ $\Delta$ 1D-43N] ApoA-I en la cual las hélices anfipáticas pueden adaptarse a un modelo esférico y permiten la inserción de otra molécula de ApoA-I, generando un dímero, así como de otras apolipoproteínas [9].

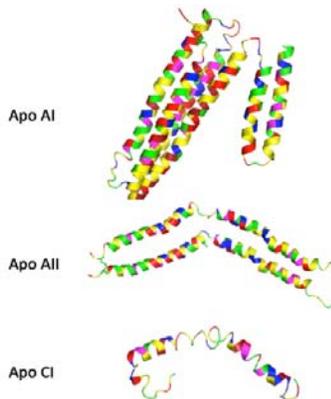


**Fig. 3.** Cambios conformacionales de la ApoA-I en HDL. En esta caricatura se muestran los cambios en la estructura secundaria de ApoA-I y la transición de HDL discoidal a esférica. Modificado de *Boston Heart Diagnostics Corporation* [10].

### Características estructurales de las apolipoproteínas

Las apolipoproteínas generalmente están compuestas de una serie de hélices- $\alpha$  anfipáticas y juegan un papel importante en el metabolismo de lípidos debido a las múltiples funciones que desempeñan (Fig.4). Las apolipoproteínas permiten estabilizar a las partículas lipoproteicas, sirven como cofactores y moduladores de reacciones enzimáticas y direccionan los lípidos a órganos blanco mediante una interacción con un receptor específico. Las apolipoproteínas más abundantes son la ApoB-100 y la ApoA-I, las cuales se han estudiado ampliamente. El papel de estas apolipoproteínas en el metabolismo lipídico está bien definido: la ApoB-100 regula el metabolismo de la LDL mediante la endocitosis de esta partícula por el receptor de LDL. La ApoA-I que también se encuentra en los quilomicrones (Qm), es transferida a la HDL en cuando entran a la circulación plasmática. Existen apolipoproteínas menos abundantes como

son ApoC-I, ApoC-III, ApoE y ApoA-IV las cuales parecen tener funciones superpuestas en el metabolismo de las HDL, LDL y VLDL (Tabla 1).



**Fig. 4.** Estructura secundaria de apolipoproteínas mostrando su conformación helicoidal hélice- $\alpha$ . El código de color para los residuos es: magenta-aromático, amarillo-alifático, no polar-verde, positivamente cargado-azul, negativamente cargado-rojo.

**Tabla 1.- Características más importantes de algunas apolipoproteínas presentes en las HDL.**

Apo	PM (Daltons)	pl	Localización	Conc. Plasmática (mg/dL)	Función
<b>A-I</b>	29,016	5.9-5.4	HDL, Qm	100-150	Principal componente de las HDL, activador de LCAT, estimula el eflujo del colesterol
<b>A-II</b>	14,414	5.0	HDL	30-50	Proteína componente de HDL, inhibidor de LH y de la LCAT
<b>A-IV</b>	44,465	5.5	HDL, Qm	15	Activador de LCAT, modulador de LPL y estimula el eflujo de colesterol.
<b>C-I</b>	6,630	7.5	HDL, VLDL, Qm	4-6	Activador de LCAT, inhibe la captación hepática de triglicéridos
<b>C-II</b>	8,900	4.9	HDL, VLDL, Qm	3-5	Activador de LPL
<b>C-III</b>	8,800	4.5-5.0	HDL, VLDL, Qm	12-14	Inhibidor de la LPL
<b>E</b>	34,145	6.0-5.7	VLDL, HDL	3-5	Ligando de receptor de LDL y de residuos de Qm.

**PM:** Peso molecular, **pl:** Punto Isoeléctrico.

En las secciones siguientes solo se describen detalles de ApoC-I y ApoA-I por su relevancia en este trabajo.

### **Apolipoproteína C-I**

La apolipoproteína C-I se encuentra principalmente en la VLDL y en menor proporción en la HDL, es la lipoproteína de menor tamaño. Entre sus funciones destacan que activa la esterificación de colesterol por medio de la enzima LCAT [11,12] y estimula el crecimiento celular [13]. Disminuye la unión de lipoproteínas de densidad intermedia (IDL del inglés *intermedia density lipoprotein*) y de VLDL al receptor de LDL mediada por la apolipoproteína E [14] así como la unión de VLDL a la proteína relacionada con el receptor de LDL (LRP del inglés *LDL-receptor-related protein*) [15,16]. Tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad de la lipasa lipoproteica (LPL) [17] y la lipasa hepática (LH) [18]. La ApoC-I es el mayor inhibidor plasmático de la proteína CETP. La ApoC-I es una proteína de una sola cadena, posee 57 aminoácidos y tiene un peso molecular de 6.63 kDa. Existe una estructura tridimensional de ApoC-I definida mediante RMN en presencia de micelas de dodecil sulfato de sodio (SDS del inglés *sodium dodecyl sulfate*) (Fig. 5A) [19]. La estructura por RMN de esta proteína muestra que tiene dos hélices denominadas  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  ubicadas en los residuos 7A-29I y 38M-52K, con una longitud de 28.5 Å y 40.5 Å, respectivamente, las cuales están unidas por un segmento de estructura secundaria al azar, que se encuentra en los residuos 30V-37A [19]. 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 [20]. Debido a su alta plasticidad conformacional los algoritmos existentes para determinar estructura secundaria como el programa GOR



podría involucrar de forma más importante el grupo glicerofosforilcolina en la interfase hidrofílica/hidrofóbica en los agregados micelares estudiados, en lugar de las cadenas hidrocarbonadas [23,24]. Las dos hélices- $\alpha$  que conforman a la ApoC-I son del tipo anfipático y se ha documentado que este tipo de estructuras juegan un papel muy importante en el remodelamiento de las lipoproteínas [25,26]. En la literatura existen descritos varios tipos de hélices- $\alpha$  anfipáticas de acuerdo a sus propiedades estructurales y fisicoquímicas: A, H, L, K, G, C, M, Y [27,20]. Las dos hélices- $\alpha$  que conforman a la ApoC-I pertenecen a la clase de hélice anfipática tipo A, que está conformada por residuos de aminoácidos cargados positivamente localizados en la interfase polar-no polar y los residuos de aminoácidos con carga negativa localizados en el centro de la cara polar.

Nuestro grupo de trabajo ha propuesto una nueva clase de hélice anfipática denominada "M-like", encontrada en la región C-terminal (453G-476S) de la proteína CETP [26]. La característica más importante de esta nueva clase es la presencia de tres residuos de aminoácidos con carga negativa y solamente uno con carga positiva, por lo cual no corresponde a ninguna de las clases descritas por Segrest y col. (1990,1992) [20,27]. La caracterización de las propiedades fisicoquímicas del segmento C-terminal (465E-476S) de CETP, nombrado hélice-X<sup>12</sup> y registrado con la patente No. MX-a-2012-007682 indica que una vez que esta hélice se une a la lipoproteína podría interactuar favorablemente con las cadenas acílicas de los fosfolípidos que la componen [28-30]. La distribución asimétrica de los residuos hidrofóbicos a lo largo de la secuencia de la hélice helix-X<sup>12</sup> sugiere que presenta una orientación oblicua relativa al plano de los fosfolípidos. Esta propiedad estructural se ha observado en péptidos antimicrobianos, los cuales tienen la particularidad estructural de generar hélices- $\alpha$

orientadas de forma oblicua al penetrar las membranas, promoviendo de esta manera efectos de fusión de membrana y hemólisis [31].

En nuestro grupo se ha estudiado el comportamiento fisicoquímico de varias apolipoproteínas (C-I, C-III, A-I y A-II) en monocapas de Langmuir sometidas a diferentes presiones laterales en ausencia y en presencia de lípido [32-36]. 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 isotermas presión superficial–área por molécula (p-A) para cada una de las apolipoproteínas y al analizar éstas se observó que la correspondiente a la ApoC-I presenta un especial punto de inflexión, el cual fue asociado al desprendimiento de la interfase de una de las dos hélices- $\alpha$  que la componen. Esto ha sido corroborado mediante técnicas de microscopía de ángulo de Brewster y difracción de rayos-X de ángulo rasante [37]. Probablemente la ApoC-I utilizó a manera de “bisagra” el segmento desestructurado que tiene entre las hélices  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ .

El cambio en la estructura de la ApoC-I sobre una monocapa de fosfolípidos en respuesta a presión lateral, pudiera extrapolarse al fenómeno que ocurre en la superficie de la HDL naciente, cuando pasan de una forma discoidal y tamaño pequeño (pre  $\beta$ -1HDL) a una forma esférica y de mayor tamaño ( $\alpha$ -1HDL) [38,23]. Las pre  $\beta$ -1 HDL presentan a la ApoA-I como único componente proteico y las  $\alpha$ -1HDL tienen un alto contenido de proteína en su superficie (ApoA-I, ApoA-II, ApoC-I, y ApoE) así como proteínas accesorias: PLTP, CETP y LCAT que van adquiriendo durante su

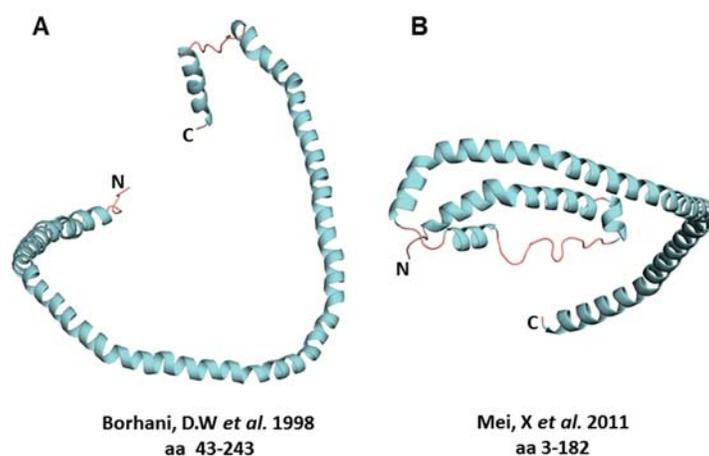
remodelamiento. Debido a la proximidad entre los fosfolípidos que conforman la partícula HDL discoidal existe una repulsión electrostática entre las moléculas originando una baja tensión interfacial. Esto permite que dominios clave de la ApoA-I se encuentren embebidos en la monocapa lipídica. La tensión interfacial de la HDL aumenta cuando alcanza una mayor dimensión y adquiere una conformación esférica, en consecuencia los elementos helicoidales antes inmersos en la monocapa lipídica son expuestos para interactuar con otras proteínas o inclusive podría promover el intercambio hacia otras lipoproteínas. Diferentes factores, entre ellos el cambio de forma y tamaño de la HDL durante su tránsito por el plasma podrían inducir cambios conformacionales también en la ApoC-I. De esta manera la ApoC-I podría estar regulando procesos como la activación o inhibición enzimática y el transporte de lípidos en la HDL.

### **Apolipoproteína A-I**

La ApoA-I es la apolipoproteína más abundante y además de participar en el metabolismo lipídico presenta funciones anti-inflamatorias así como antioxidantes [39,40]. La ApoA-I consta de una sola cadena polipeptídica de 28 kDa, compuesta de 243 aa organizados en bloques característicos de 22 y 11 residuos. Mediante cálculos termodinámicos, de momento hidrofóbico ( $\mu H$ ) y algoritmos de predicción de estructura secundaria se predijo que la ApoA-I está compuesta por hélices- $\alpha$  de tipo anfipático. [41]. La determinación de la estructura tridimensional por difracción de rayos X confirmó estos análisis teóricos [42,20]. La ApoA-I se ha estudiado en su estado libre y en modelos de membrana debido a la importancia que implica conocer los procesos que originan a las HDL nacientes, así como los mecanismos precisos que realiza esta

proteína en complejo con la HDL en el transporte reverso de colesterol. Las hélices que componen a la ApoA-I, se han clasificado de la siguiente manera (1-45 aa) G\*, (44-65,66-87,121-142,143-164,165-186,187-208) A y (88-98,99-120,209-219,220-241) Y. Las hélices tipo G\* se consideran de tipo hélice anfipática, y conforman el interior de las proteínas globulares, por lo cual los aminoácidos que la constituyen son principalmente hidrofóbicos. Las hélices anfipáticas tipo A presentes en esta proteína tienen las mismas características que en la ApoC-I. Por otro lado, las hélices de tipo Y poseen en su cara polar tres grupos de aminoácidos con carga positiva separados por dos grupos de aminoácidos negativos, además tienen valores intermedios de hidrofobicidad y de momento hidrofóbico en su cara no polar con respecto a otros tipos de hélices anfipáticas en apolipoproteínas intercambiables [20]. En la estructura cristalina obtenida por Borhani *et al.* 1997, el segmento N-terminal se encuentra truncado ( $\Delta$ 1D-43N) y la ApoA-I presenta una estructura de hélice- $\alpha$  con una conformación de cinturón (Fig. 6A) [9]. Esta estructura tiene la particularidad de mostrar una conformación semejante a la que tendría en presencia de lípido. La estructura de ApoA-I obtenida por Mei X. *et al.* 2006 presenta el segmento C-terminal deletado ( $\Delta$ 185G-243Q) generando una conformación dividida en un dominio N-terminal y otro C-terminal conformados por 4 y dos hélices- $\alpha$  respectivamente (Fig. 6B) [43]. Así mismo, mediante técnicas espectroscópicas se ha observado que la ApoA-I libre de lípido en solución presenta un arreglo en dos dominios semejante al observado en la estructura cristalina, pero con mucho menos organización [6]. Diversos estudios han evaluado la afinidad de unión a lípidos de cada una de las hélices- $\alpha$  que componen a la ApoA-I, observando que el dominio N-terminal determina la estructura abierta o cerrada de la proteína ApoA-I y ésta es modulada por la presencia de colesterol que obtiene al interactuar con la

proteína ABCA1 dando origen a las HDL nacientes. Por su parte, el dominio C-terminal de ApoA-I dada su alta hidrofobicidad es un motivo de anclaje a las membranas lipídicas y determina el tamaño de la HDL discoidal [6,44]. Estos estudios toman como base el modelo ampliamente aceptado para la HDL discoidal, el cual es un disco conformado por una bicapa lipídica rodeado por las hélices de la ApoA-I con su eje largo perpendicular a las cadenas acilo de los fosfolípidos [45,27].

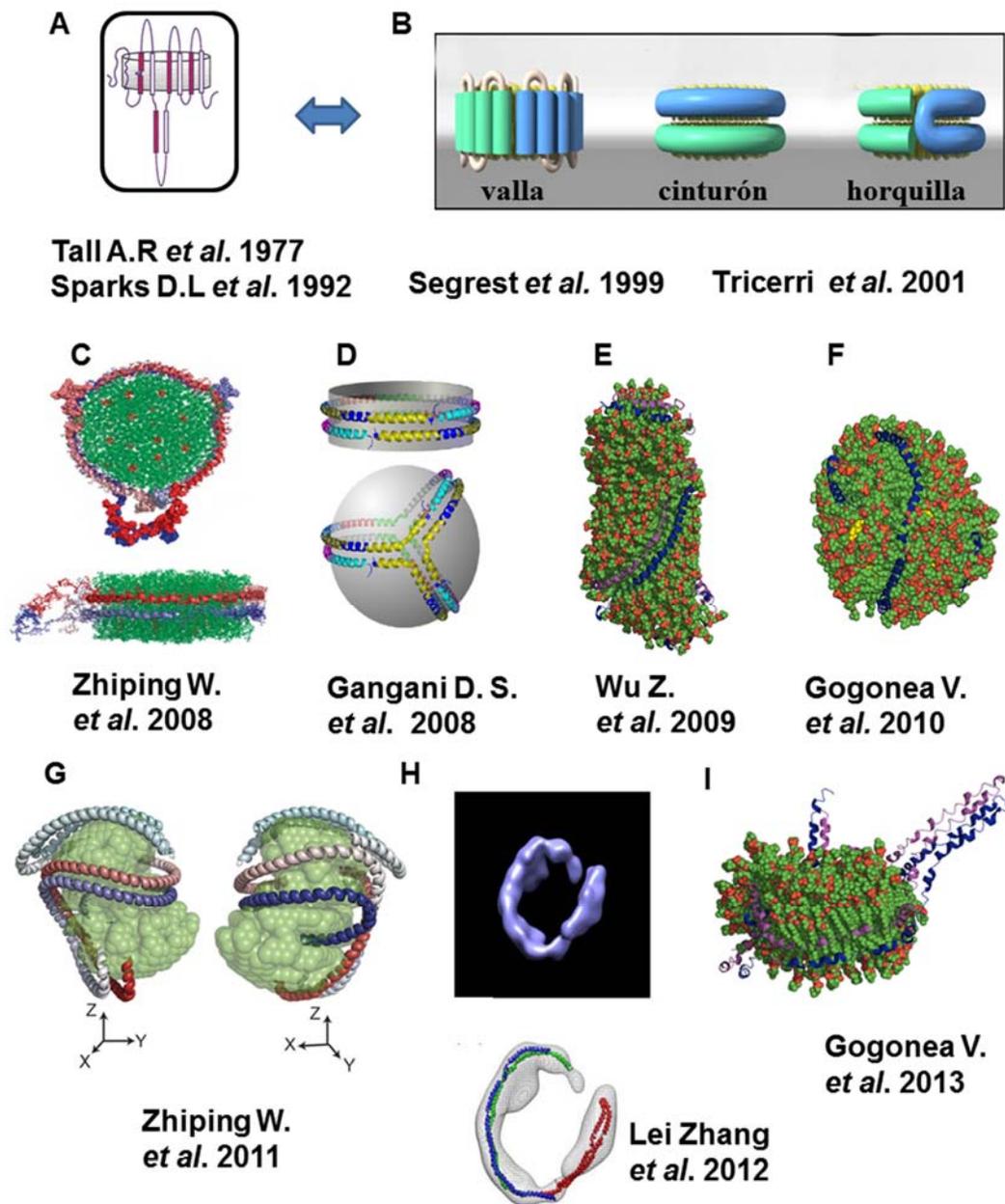


**Fig. 6.** Estructuras cristalinas de ApoA-I. A) Proteína nativa deletada en los aminoácidos 1D-43N y expresada en *Escherichia coli*, Código PDB: 1av1[9]. B) Proteína nativa deletada en los aminoácidos 185G-243Q y expresada en *Escherichia coli*, Código PDB: 3r2p [43].

### Métodos para determinar la estructura de ApoA-I en la HDL

La HDL es una partícula altamente dinámica por lo cual ha sido complicado estudiarla y en un inicio solo se tenían modelos teóricos basados en datos termodinámicos de ApoA-I en presencia de lípidos, así se generaron los modelos de valla, cinturón y de horquilla. Segrest y col. (2000) propusieron un modelo de doble cinturón para la HDL discoidal [46]. El modelo consiste en dos moléculas de ApoA-I asociadas a lípido con

una conformación de hélice- $\alpha$  anfipática, en posición perpendicular y rodeando una bicapa conformada por 160 moléculas de 1-palmitoil-2-oleil-fosfatidilcolina. El modelo de HDL discoidal presenta un diámetro de 106 Å y aunque depende de ciertas características observadas en la estructura cristalina de ApoA-I, su conformación se ha podido confirmar por diversos métodos experimentales. Actualmente existen varios modelos de la partícula HDL discoidal y esférica generados a partir de datos experimentales y teóricos (Fig. 7).



**Fig. 7.** Modelos generados de ApoA-I en HDL mediante métodos teóricos y experimentales. A, B) Modelo de valla, cinturón y horquilla basados en datos termodinámicos de interacción de ApoA-I con lípidos [4,46-48]. C) Modelo generado mediante experimentos de intercambio de deuterio [49]. D) Estructura generada por experimentos de reticulación [50]. E, F) Estructuras generadas mediante dinámicas moleculares [51,52]. G) Modelo generado por experimentos de RMN [53]. H) Modelo generado por tomografía crioelectrónica [54]. I) Estructura generada por dispersión de neutrones de bajo ángulo [55].

## Proteínas con plegamiento anómalo y enfermedad

Mediante diversos estudios *in vitro* se ha observado que en general, las proteínas tienen la habilidad de formar agregados de tipo amiloide. Sin embargo, en la naturaleza solo algunas encuentran las condiciones que detonan esta capacidad y no presentan una relación clara a nivel de estructura primaria entre ellas [56-58]. Se ha demostrado que péptidos y proteínas participan en la formación de agregados de tipo fibrilar, estas estructuras fibrilares son conocidas como amiloides cuando se encuentran de forma intra o extracelular en uno o varios tejidos. Las estructuras amiloides se encuentran asociadas a enfermedades de tipo local como el Alzheimer e Insulinomas de los islotes de Langerhans, a enfermedades sistémicas que incluyen a la amiloidosis sistémica ATTRV30M (mutante amiloide de la proteína transtiretina) así como las amiloidosis provocadas por fragmentos del amino terminal de las apolipoproteínas A-I, A-II y A-IV [59]. Las fibras amiloides comparten tres características comunes: una apariencia filamentosa observada con el microscopio electrónico; un diagrama característico obtenido mediante difracción de rayos X que indica que están conformadas principalmente por elementos  $\beta$ -cruzada y una birrefringencia verde observada mediante tinción con Rojo Congo [60]. En general, se ha observado que las fibras amiloides se generan a partir de protofibrillas formadas por estructura cruzada tipo  $\beta$  las cuales se orientan de forma perpendicular a lo largo del eje de la fibra, resultando en la propagación de hojas- $\beta$  en dirección de la fibra. Las protofibrillas crecen longitudinalmente de forma rápida por la presencia de estructuras globulares que van añadiendo cantidades importantes de proteína de manera pre-ordenada en los extremos [61]. En el caso de un proceso amiloidogénico, el término “estructura globular” se refiere a la formación de agregados de proteína con una conformación esférica. En

una segunda fase se asocian lateralmente generando gruesos haces de fibras [62]. Estas anomalías fueron reconocidas dentro de un grupo de enfermedades generadas por proteínas mal plegadas, lo que incentivó aún más la necesidad de conocer en detalle las fuerzas que dirigen el plegamiento de las proteínas hasta llegar a su estructura nativa.

### **Interacciones involucradas en el plegamiento de proteínas**

Se conoce que las proteínas se pliegan, salvo en algunas excepciones, por el efecto de interacciones del tipo no covalentes como son puentes de hidrógeno e interacciones iónicas, hidrofóbicas y de van der Waals. Es claro que deben considerarse en el plegamiento proteico todos los tipos de interacciones intermoleculares sin embargo, estudios *in silico* realizados en los 80's mostraron un componente dominante en el plegamiento: la interacción hidrofóbica. Existen varias evidencias que apoyan esta observación como son: (a) La presencia de "núcleos hidrofóbicos" en las proteínas, debido a la compactación de las cadenas laterales como consecuencia del efecto hidrofóbico [63- 66]. (b) Las proteínas se desnaturalizan en medios no polares [67]. (c) En el diseño de proteínas, se observó que al conservar un perfil hidrofóbico y polar correcto utilizando aminoácidos comunes (variantes proteicas) o un código ampliado de aminoácidos no naturales (foldámeros), se obtiene un plegamiento con la forma nativa esperada [68-72]. Para estudiar el proceso de plegamiento, que es una compleja transición en general del desorden al orden se han propuesto modelos teóricos [73-78] y se han realizado experimentos tanto *in vitro* [79-81] como *in silico* [82-87]. Actualmente la visión del plegamiento se describe como la idea de "paisaje energético" haciendo una analogía al "embudo de plegamiento". La forma de embudo constituye

una analogía que sugiere un plegamiento rápido, en donde la entropía conformacional (anchura del embudo) y la energía libre de las conformaciones proteicas (altura del embudo) van disminuyendo al acercarse al estado nativo. Este embudo puede ser rugoso, con depresiones más o menos profundas, que corresponden a intermediarios de plegamiento. Algunas de estas rugosidades corresponden a trampas cinéticas donde las moléculas de proteína que hayan seguido ciertas trayectorias podrían disminuir su velocidad o quedar atrapadas en estos estados. La trayectoria que sigan la mayoría de las moléculas son las que caracterizan el estado macroscópico del sistema. En proteínas donde se ha observado un mal plegamiento a pesar de no estar mutadas, ha sido muy útil la caracterización de la ruta de plegamiento que siguen debido a que se encuentran los puntos críticos en este proceso.

### **Desorden intrínseco en la estructura de proteínas**

Con el desarrollo de bases de datos de estructuras cristalográficas y modelado por homología se consideró innecesario saber la ruta de plegamiento para conocer la estructura tridimensional de la proteína. Sin embargo, debido a la técnica experimental con la que se generaron estas bases se complica modelar proteínas con segmentos intrínsecamente desordenados. Una proteína que no está plegada o un segmento desordenado no se puede cristalizar debido a la variación en la posición de una proteína con respecto a la siguiente y esto produce un error en la dispersión coherente de rayos X. Por otro lado, la técnica de RMN nos proporciona un conjunto de estructuras tridimensionales en solución y esto nos permite determinar en las proteínas los segmentos con mayor tendencia al desorden. Este desorden intrínseco, se relaciona con diversas funciones de las proteínas como por ejemplo el reconocimiento molecular

por calmodulina, la cual consiste de dos dominios globulares que en solución presentan un intercambio entre varias conformaciones [88]. Esta plasticidad se ve reflejada en la habilidad para unir diferentes ligandos. En otro caso, se propicia la activación enzimática del tripsinógeno, mediante digestión proteolítica remueve un péptido localizado dentro de un dominio desordenado del amino terminal y la convierte en tripsina, que es una proteína con actividad proteolítica [88]. En las proteínas como las apolipoproteínas las transiciones desorden-orden son clave para que realicen funciones como el transporte de lípidos, activación o inhibición de diversas enzimas para el remodelamiento de las lipoproteínas y su intercambio entre partículas lipoproteicas. El origen estructural de este tipo de transiciones en las lipoproteínas podría estar generado por la presencia de diferentes tipos de hélices- $\alpha$  anfipáticas. La transición entre dos tipos diferentes de hélices- $\alpha$  genera una disrupción en la estructura helicoidal [23,89]. Por otro lado, la presencia de aminoácidos como argininas también genera un efecto de desorden en la estructura secundaria [90].

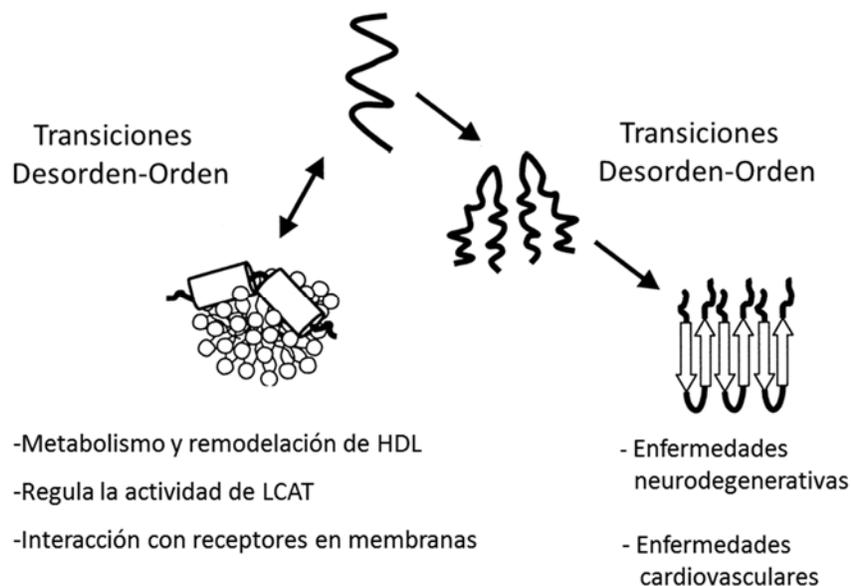
### **Efectos del desorden intrínseco en la estructura de ApoA-I**

Se sabe perfectamente que la ApoA-I presenta cambios estructurales entre los estados delipidado y el altamente lipidado [46,91-94]. Así mismo, se ha observado que los primeros 98 residuos del N-terminal son importantes en la estabilización de la estructura libre de lípido [9,41]. Un análisis detallado por RMN en medio mimético a lípido, muestra que el segmento N-terminal, constituido por el residuo 1D al 43N, presenta segmentos desestructurados específicamente en los residuos 1D-7P y 33F al 44L, éste último separa el dominio N-terminal del resto de la molécula [7]. Adicionalmente, en las predicciones de estructura secundaria de ApoA-I, el N-terminal presenta la mayor

dificultad para asignarle una estructura secundaria. Esto se ve reflejado en los cambios conformacionales drásticos que se presentan cuando se une a lípido [6]. La afinidad moderada de este segmento por lípido y su independencia del resto de la molécula [95], sugieren que el N-terminal de la ApoA-I acoplada a la HDL no se encuentra unida a la superficie de esta partícula y podría servir como dominio de reconocimiento de lípidos o de su receptor en la superficie de las células. Por otra parte, el C-terminal presenta un papel importante en la estructura de la molécula libre y/o pobre de lípido, por ser el dominio de unión inicial a las lipoproteínas [6,96-100]. Estudios de proteólisis sugieren fuertemente que esta región en un estado libre de lípido, también es altamente desestructurada [101-103]. La existencia de segmentos desordenados dentro de la estructura nativa de las proteínas las clasifica dentro del grupo de proteínas intrínsecamente desordenadas y se ha observado que son susceptibles a hidrólisis enzimática. Existen varios trabajos que reportan la formación de fibras amiloides por fragmentos derivados de los dominios N y C-terminal de ApoA-I nativa bajo condiciones de estrés oxidativo, generados por procesos infecciosos y/o inflamatorios, así como por enfermedades metabólicas debido a la presencia de enzimas proteolíticas (quimasa, transteritina, metaloproteinasa y mieloperoxidasa) [14]. Se piensa que en casos de infección los fragmentos liberados de ApoA-I podrían tener una función de tipo antimicrobiano como se ha observado en otras apolipoproteínas [104-106]. En general, Lagerstedt y col. (2007) han observado que la proteína nativa no es inherentemente amiloidogénica [107]. Sin embargo, existen isoformas de ApoA-I que la hacen susceptible a un proceso de proteólisis generando segmentos que posteriormente se agregan formando depósitos de fibras amiloides en tejidos y órganos, relacionados con enfermedades amiloidogénicas [108-114] y cardiovasculares [115]. En casi todos estos trabajos se aislaron de los depósitos amiloideos, péptidos de ApoA-I con longitudes que

van de los primeros 80 a 93 residuos del N-terminal. En general, los niveles de proteína ApoA-I mutada en plasma son bajos en comparación de la forma nativa por lo que se considera que existe un control intracelular del plegamiento proteico que representaría la primera línea de defensa contra la secreción de las variantes patogénicas [116]. Así mismo, se ha observado la formación de estructuras amiloides con la molécula de ApoA-I completa cuando se alcanza un pH de 5.5, como es el caso del microambiente en placas ateroscleróticas o con la oxidación de las metioninas en su secuencia [117,118]. Otro tipo de daño generado por modificaciones en la estructura tridimensional de ApoA-I es debido a la presencia de moléculas altamente oxidantes. Estas modificaciones podrían disminuir la capacidad de generar transiciones desorden-orden obstruyendo su interacción con la proteína de membrana ABCA1. Una consecuencia es que la ApoA-I modificada permanece con un mínimo de lípido e interactúa directamente con lípidos de las células generando una deformación y rompimiento de membranas neuronales como se ha observado en algunas enfermedades neurodegenerativas [119]. En los casos donde la ApoA-I presenta proteólisis, los fragmentos se liberan al medio extracelular. Estos fragmentos se agregan en mayor o menor grado dependiendo principalmente de la secuencia y/o del ambiente como la presencia de altas concentraciones de colesterol o balsas lipídicas en las membranas sirviendo como catalizador para desarrollar una enfermedad de tipo amiloide [120-122]. En las diferentes conformaciones observadas en las apolipoproteínas, las cuales dependen tanto de la secuencia como del microambiente, unas son favorables para realizar funciones dentro del metabolismo de lípidos y otras inducen agregación que termina manifestándose en algún tipo de enfermedad (Fig. 8). En este contexto, es evidente el efecto positivo de las transiciones de tipo desorden-orden en donde se pasa de una estructura desordenada en ApoA-I o ApoC-I a una

conformación de hélice- $\alpha$  para llevar a cabo la remodelación lipídica en las lipoproteínas, activar enzimas e interactuar con sus receptores [23,61]. Por otro lado, la transición de una estructura desordenada a una de tipo beta está asociada a enfermedades amiloides como el Alzheimer, aterosclerosis y en otras proteínas; este tipo de transiciones generan cáncer y diabetes debido a la agregación de la proteína P53 e insulina, respectivamente [123]. Así mismo, una transición del tipo orden-desorden que va de una estructura hélice- $\alpha$  a una al azar, permite que las apolipoproteínas mantengan una plasticidad estructural para interactuar con diversos receptores así como para intercambiarse entre lipoproteínas.



**Fig. 8.** Transiciones conformacionales en lipoproteínas. En este esquema se ilustra el efecto “benéfico” de las transiciones de estructura desordenada a hélice- $\alpha$  y viceversa. Por otro lado se muestra la asociación con enfermedades en las transiciones conformacionales de desorden a estructura  $\beta$ . Modificado de Hatters DM *et al.*, (2001) [124].

## **Importancia del diseño de péptidos para estudios de estructura/actividad en proteínas y generación de fármacos**

Varios estudios con péptidos han servido para entender la relación estructura/función en proteínas. Estos estudios se han abordado en general desde dos puntos diferentes, por un lado se han diseñado *de novo* péptidos y proteínas [125-128] y por otro se han aislado los segmentos clave dentro de la estructura proteica para a partir de ellos generar péptidos con una función [129-131]. En el primer caso, se analizó como introducir funciones biológicas a péptidos diseñados desde cero [132-134]. Sin embargo, se observó que al plegarse se estacionaban en la etapa de “glóbulo fundido”, el cual carece de una estructura terciaria única y por tanto son menos activos que sus homólogos. Una estrategia alternativa que se ha seguido, es insertar estos sitios activos o motivos de unión a proteínas dentro de secuencias proteicas no relacionadas. Mediante la utilización de motivos estructurales diseñados por la naturaleza, se evita el paso de caer en una conformación de “glóbulo fundido”. El uso de motivos naturales con estructuras terciarias bien definidas puede ofrecer una actividad biológica y una estabilidad similar o mejorada en relación con las proteínas nativas. En el segundo caso, donde se ha optado por el diseño de péptidos derivados de sitios biológicamente activos, muchos de estos estudios avanzaron a la etapa de desarrollo de una molécula terapéutica [135,136]. Sin embargo, usarlo directamente como fármaco no es lo más idóneo debido a que podría perder su función al administrarse por vía oral. Los péptidos naturales pueden ser degradados por proteasas, por ello se rediseñan tomando solo los elementos críticos y se montan en un andamio modificado. Esto los convierte en un péptido híbrido optimizado, el cual puede ser valioso como un primer candidato a fármaco y eventualmente puede dar lugar a una molécula mimética no peptídica. Este

último está diseñado para ser resistente a las proteasas que destruirían un péptido natural, además de que posee propiedades farmacéuticas similares a las de un medicamento. Con esta metodología, la cual está en pleno auge se están elaborando agonistas y antagonistas a receptores con fines farmacológicos, vacunas, péptidos antipatógenos y para diagnóstico. Actualmente no se puede hablar de desarrollo de fármacos sin involucrar la investigación y diseño de péptidos o moléculas miméticas.

En este trabajo de tesis doctoral, en el cual con base en análisis teóricos y estudios experimentales utilizando péptidos, nosotros proponemos que determinados segmentos intrínsecamente no estructurados en la apolipoproteína A-I y C-I pudieran ser sitios biológicamente importantes. Esta estrategia experimental nos permitió entender a nivel atómico el mecanismo por el cual estas proteínas realizan funciones como la activación enzimática, el intercambio entre lipoproteínas, transporte de lípido y reconocimiento de su receptor en las células. La identificación de estos segmentos en las apolipoproteínas A-I y C-I sin duda abre un camino hacia posteriores estudios de tipo farmacológico para modular por ejemplo, el transporte reverso del colesterol.

## Referencias

1. Manzano-León N, Delgado-Coello B, Guaderrama-Díaz M, Mas-Oliva J.  $\beta$ -adaptin: Key molecule for microglial scavenger receptor function under oxidative stress, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 351 (2006) 588-594.
2. Krieger M. Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems, *J. Clin. Invest.* 108 (2001) 793-797.
3. Aguilar-Espinosa SL, Mendoza-Espinosa P, Delgado-Coello B, Mas-Oliva J. Lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) activity in the presence of Apo-AI-derived peptides exposed to disorder-order conformational transitions, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 441 (2013) 469-475.
4. Sparks DL, Phillips MC, Lund-Katz S. The conformation of apolipoprotein A-I in discoidal and spherical recombinant high density lipoprotein particles, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 25830-25838.
5. Hybrid Medical Animation / Photo Researchers:  
[http://www.sciencephoto.com/search?subtype=keywords&searchstring=lipoprotein&Search.x=18&Search.y=10&media\\_type=images&license=all&chann](http://www.sciencephoto.com/search?subtype=keywords&searchstring=lipoprotein&Search.x=18&Search.y=10&media_type=images&license=all&chann)
6. Kono M, Okumura Y, Tanaka M, Nguyen D, Dhanasekaran P, *et al.* Conformational flexibility of the N-terminal domain of apolipoprotein a-I bound to spherical lipid particles, *Biochemistry* 47 (2008) 11340-11347.

7. 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.* 517 (2002) 139-143.
8. Lagerstedt JO, Cavigliolo G, Budamagunta MS, Pagani I, Voss JC, Oda MN. Structure of apolipoprotein A-I N terminus on nascent high density lipoproteins, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 2966-2975.
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. U S A* 94 (1997) 12291-12296.
10. Boston Heart Diagnostics Corporation:  
[http://www.bostonheartdiagnostics.com/science\\_portfolio\\_map\\_test.php](http://www.bostonheartdiagnostics.com/science_portfolio_map_test.php)
11. Albers JJ, Lin J, Roberts GP. Effect of human plasma apolipoproteins on the activity of purified lecithin: cholesterol acyltransferase, *Artery* 5 (1979) 61-75.
12. 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.* 265 (1990) 22123-22129.
13. Tournier JF, Bayard F, Tauber JP. Rapid purification and activity of apolipoprotein C-I on the proliferation of bovine vascular endothelial cells in vitro, *Biochim. Biophys. Acta.* 804 (1984) 216-220.
14. 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.* 266 (1991) 18259-18267.
15. 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.* 265 (1990) 22453-22459.
16. 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.* 35 (1994)134-142.
17. Brown WV, Baginsky ML. Inhibition of lipoprotein lipase by an apoprotein of human very low density lipoprotein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46 (1972) 375-382.
18. Kinnunen PK, Ehnolm C. Effect of serum and C-apoproteins from very low density lipoproteins on human postheparin plasma hepatic lipase, *FEBS Letters.* 65 (1976) 354-357.
19. Rozek A, Sparrow ST, Weisgraber KH, Cushley RJ. Conformation of Human Apolipoprotein C-I in a Lipid-Mimetic Environment Determined by CD and NMR Spectroscopy, *Biochemistry* 38 (1999)14475-14484.
20. 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.* 33 (1992) 141-66.
21. Morrisett JD, Jackson RL, Gotto Jr. AM. Lipid-Protein interactions in the plasma lipoproteins, *Biochim. Biophys. Acta* (1976) 94-133.
22. Klockowski A, Ting KL, Jernigan RL, Garnier J. Protein secondary structure prediction based on the GOR algorithm incorporating multiple sequence alignment information, *Polymer* 43 (2002) 441-449.
23. Mendoza-Espinosa P, Moreno A, Castillo R, Mas-Oliva J. Lipid dependant disorder-to-order conformational transitions in apolipoprotein C-I derived peptides, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 365 (2008) 8-15.
24. Mendoza-Espinosa P. Correlación estructura/función de apolipoproteínas plasmáticas. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, México 2007, Impresa.
25. Gursky O, Atkinson D. Thermal unfolding of human high-density apolipoprotein AI: implications for a lipid free molten globular state, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93 (1996)2991-2995.
26. Bolaños-García VM, Soriano-García M, Mas-Oliva J. CETP and exchangeable apoproteins: Common features in lipid binding activity, *Mol. Cell. Biochem.* 175 (2010)1-10.
27. Segrest JP, Loof H, Dohlman JG, Brouillette CG, Anantharamaiah GM, Amphipathic Helix Motif: Classes and Properties. *Proteins* 8 (1990) 103-117.
28. García-González V, Gutiérrez-Quintanar N, Mendoza-Espinosa P, Brocos P, Piñeiro A, Mas-Oliva J. Key structural arrangements at the C-terminus domain of CETP suggest a potential mechanism for lipid-transfer activity, *J. Struct. Biol.* 186 (2014) 19-27.
29. Garcia-Gonzalez V, Mas-Oliva J. Amyloidogenic Properties of a D/N Mutated 12 Amino Acid Fragment of the C-Terminal Domain of the Cholesteryl-Ester Transfer Protein (CETP), *Int. J. Mol. Sci.* 12 (2011) 2019-2035.
30. Garcia-Gonzalez V, Mas-Oliva J. Amyloid fibril formation of peptides derived from the C-terminus of CETP modulated by lipids, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 434 (2013) 54-59.
31. Dennison SR, Harris F, Phoenix DA. Are oblique orientated alpha-helices used by antimicrobial peptides for membrane invasion? *Protein Pept. Lett.* 12 (2005) 27-29.
32. Campos J, Mas-Oliva J, Castillo R. Interaction and conformations of a-helical human apolipoprotein C-I on hydrophilic and hydrophobic substrates, *J. Phys. Chem. B* 108 (2004) 20442-20450.

33. Bolaños G, Mas-Oliva J, Ramos S, Castillo R. Phase transitions in monolayers of human apolipoprotein C-I, *J. Phys. Chem. B* 103 (1999) 6236–6242.
34. Bolaños G, Ramos S, Castillo R, Xicohtencatl J, Mas-Oliva J. Monolayers of Apolipoproteins at the Air/Water Interface, *J. Phys. Chem.* 105 (2001) 5757-5765.
35. Xicohtencatl-Cortes J, Mas-Oliva J, Castillo R. Phase transitions of phospholipid monolayers penetrated by apolipoproteins, *J. Phys. Chem. B* 108 (2004) 7307-7315.
36. Mas-Oliva J, Moreno A, Ramos S, Xicohtencatl-Cortés J, Campos J, Castillo R, 2003. Monolayers of apolipoprotein AII at the air/water interface, p. 341-352, in: N. S. Dhalla, *et al.*, *Frontiers in cardiovascular health*, Kluwer Academic Publishers, Boston, USA.
37. Ruíz GJ, Moreno A, Brezesinski G, Möhwald H, Mas-Oliva J, Castillo R. Phase transitions and conformational changes in monolayers of human apolipoproteins CI and AII, *J. Phys. Chem. B* 107 (2003) 11117–11124.
38. Xicohtencatl J, Castillo R, Mas-Oliva J. In search of new structural states of exchangeable apolipoproteins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 24 (2004) 467-470.
39. Baker HN, Delahunty T, Gotto AM Jr, Jackson RL. The primary structure of high density apolipoprotein-glutamine-I, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 71 (1974) 3631-3634.
40. Martinez LO, Jacquet S, Terce F, Collet X, Perret B, Barbaras R. New insight on the molecular mechanisms of high-density lipoprotein cellular interactions, *Cell. Mol. Life Sci.* 61 (2004) 2343-2360.
41. Frank PG, Marcel YL. Apolipoprotein A-I: structure-function relationships, *J. Lipid Res.* 41 (2000) 853-872.
42. Ajees AA, Anantharamaiah GM, Mishra VK, Hussain MM, Murthy HM. Crystal structure of human apolipoprotein A-I: insights into its protective effect against cardiovascular diseases, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 103 (2006) 2126-2131.
43. Mei X, Atkinson D. Crystal structure of C-terminal truncated apolipoprotein A-I reveals the assembly of high density lipoprotein (HDL) by dimerization, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 38570-38582.
44. Fang Y, Gursky O, Atkinson D. Lipid-binding studies of human apolipoprotein A-I and its terminally truncated mutants, *Biochemistry* 42 (2003) 13260-13268.
45. Garda HA. Structure–function relationships in human apolipoprotein A-I: role of a central helix pair, *Future Lipidol.* 2 (2007) 95-104.
46. Segrest JP, Li L, Anantharamaiah GM, Harvey SC, Liadaki KN, Zannis V. Structure and function of apolipoprotein A-I and high-density lipoprotein, *Curr. Opin. Lipidol.* 11 (2000) 105-115.
47. Tall AR, Small DM, Deckelbaum RJ, Shipley GG. Structure and thermodynamic properties of high density lipoprotein recombinants, *J. Biol. Chem.* 252 (1977) 4701-4711.
48. Tricerri MA, Agree AK, Sanchez SA, Bronski J, Jonas A. Arrangement of apolipoprotein A-I in reconstituted high-density lipoprotein disks: An alternative model based on fluorescence resonance energy transfer experiments, *Biochemistry* 40 (2001) 5065-5074.
49. Wu Z, Wagner MA, Zheng L, Parks JS, Shy III JM, *et al.* The refined structure of nascent HDL reveals a key functional domain for particle maturation and dysfunction, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14 (2007) 861-868.
50. Gangani D, Silva RA, Huang R, Morris J, Fang J, *et al.* Structure of apolipoprotein A-I in spherical high density lipoproteins of different sizes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 105 (2008) 12176-12181.
51. Wu Z, Gogonea V, Lee X, Wagner MA, Li XM, *et al.* Double superhelix model of high density lipoprotein, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 36605-36619.
52. Gogonea V, Wu Z, Lee X, Pipich V, Li XM, *et al.* Congruency between biophysical data from multiple platforms and molecular dynamics simulation of the double super helix model of nascent high-density lipoprotein, *Biochemistry* 49 (2010) 7323-7343.
53. Wu Z, Gogonea V, Lee X, May RP, Pipich V, *et al.* The low resolution structure of ApoA1 in spherical high density lipoprotein revealed by small angle neutron scattering, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 12495-12508.
54. Zhang L, Ren G. IPET and FETR: Experimental approach for studying molecular structure dynamics by cryo-electron tomography of a single-molecule structure, *PlosOne* 2 (2012) e30249.
55. Gogonea V, Gerstenecker GS, Wu Z, Lee X, Topbas C, *et al.* The low-resolution structure of nHDL reconstituted with DMPC with and without cholesterol reveals a mechanism for particle expansion, *J. Lipid. Res.* 54 (2013) 966-983.
56. Chiti F, Calamai M, Taddei N, Stefani M, Ramponi G, Dobson CM. Studies of the aggregation of mutant proteins in vitro provide insights into the genetics of amyloid diseases, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99 Suppl. 4 (2002) 16419-16426.
57. Dobson CM. Protein folding and its links with human disease, *Biochem. Soc. Symp.* (2001) 1-26.
58. Koo EH, Lansbury PT Jr, Kelly JW. Amyloid diseases: abnormal protein aggregation in neurodegeneration, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96 (1999) 9989-9990.
59. Chiti F, Dobson CM. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease, *Annu. Rev. Biochem.* 75 (2006) 333-366.

60. Westermark P, Benson MD, Buxbaum JN, Cohen AS, Frangione B, *et al.* A primer of amyloid nomenclature, *Amyloid* 14 (2007) 179-183.
61. Mendoza-Espinosa P, Montalvan-Sorrososa D, Garcia-Gonzalez V, Moreno A, Castillo R, Mas-Oliva J. Microenvironmentally controlled secondary structure motifs of apolipoprotein A-I derived peptides, *Mol. Cell. Biochem.* 393 (2014) 99-109.
62. DuBay KF, Pawar AP, Chiti F, Zurdo J, Dobson CM, Vendruscolo M. Prediction of the absolute aggregation rates of amyloidogenic polypeptide chains, *J. Mol. Biol.* 341 (2004) 1317-1326.
63. Dill KA, Ozkan SB, Shell MS, Weikl TR. The protein folding problem, *Annu. Rev. Biophys.* 37 (2008) 289-316.
64. Banavar JR, Maritan A. Physics of proteins, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 36 (2007) 261-280.
65. Tolstoguzov V. Origins of globular structure in proteins, *FEBS Lett.* 444 (1999) 145-148.
66. Pace CN. Contribution of the hydrophobic effect to globular protein stability, *J. Mol. Biol.* 226 (1992) 29-35.
67. Schellman JA. Temperature, stability, and the hydrophobic interaction, *Biophys. J.* 73 (1997) 2960-2964.
68. Muller MM, Windsor MA, Pomerantz WC, Gellman SH, Hilvert D. A rationally designed aldolase foldamer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48 (2009) 922-925.
69. Kammerer RA, Steinmetz MO. De novo design of a two-stranded coiled-coil switch peptide, *J. Struct. Biol.* 155 (2006) 146-153.
70. Hecht MH, Das A, Go A, Bradley LH, Wei Y. De novo proteins from designed combinatorial libraries, *Protein. Sci.* 13 (2004) 1711-1723.
71. Looger LL, Dwyer MA, Smith JJ, Hellinga HW. Computational design of receptor and sensor proteins with novel functions, *Nature* 423 (2003) 185-190.
72. Handel TD, DeGrado WF. De novo design of a Zn<sup>2+</sup>-binding protein, *J. Am. Chem. Soc.* 112 (1990) 6710-6711.
73. Lazaridis T, Karplus M. Thermodynamics of protein folding: a microscopic view, *Biophys. Chem.* 100 (2003) 367-395.
74. Fersht AR. Optimization of rates of protein folding: the nucleation-condensation mechanism and its implications, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 92 (1995) 10869-10873.
75. Fersht AR. Nucleation mechanisms in protein folding, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7 (1997) 3-9.
76. Dill KA, Fiebig KM, Chan HS. Cooperativity in protein-folding kinetics, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 90 (1993) 1942-1946.
77. Kim PS, Baldwin RL. Intermediates in the folding reactions of small proteins, *Annu. Rev. Biochem.* 59 (1990) 631-660.
78. Chothia C, Levitt M, Richardson D. Helix to helix packing in proteins, *J. Mol. Biol.* 145 (1981) 215-250.
79. Fersht AR, Sato S. Phi-value analysis and the nature of protein-folding transition states. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 101 (2004) 7976-7981.
80. Sosnick TR, Dothager RS, Krantz BA. Differences in the folding transition state of ubiquitin indicated by phi and psi analyses, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 101 (2004) 17377-17382.
81. Goldenberg DP. Genetic studies of protein stability and mechanisms of folding, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 17 (1988) 481-507.
82. Korth M, Luchow A, Grimme S. Toward the exact solution of the electronic Schrodinger equation for noncovalent molecular interactions: worldwide distributed quantum monte carlo calculations. *J. Phys. Chem. A* 112 (2008) 2104-2109.
83. Hagen SJ. Probe-dependent and nonexponential relaxation kinetics: unreliable signatures of downhill protein folding, *Proteins* 68 (2007) 205-217.
84. Sugita Y, Okamoto Y. Replica-exchange molecular dynamics method for protein folding, *Chem. Phys. Lett.* 314 (1999) 141-151.
85. Levitt M. Molecular dynamics of native protein. I. Computer simulation of trajectories. *J. Mol. Biol.* 168 (1983) 595-617.
86. Gabel D, Rasse D, Scheraga HA. Search for low-energy conformations of a neurotoxic protein by means of predictive rules, tests for hard-sphere overlaps, and energy minimization, *Int. J. Pept. Protein. Res.* 8 (1976) 237-252.
87. Gibson KD, Scheraga HA. Minimization of polypeptide energy. I. Preliminary structures of bovine pancreatic ribonuclease S-peptide, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 58 (1967) 420-427.
88. Dunker AK, Lawson JD, Brown CJ, Williams RM, Romero P, *et al.* Intrinsically disordered protein, *J. Mol. Graph. Model.* 19 (2001) 26-59.
89. Campos-Terán J, Mendoza-Espinosa P, Castillo R, Mas-Oliva J. Conformational and Disorder to Order Transitions in Proteins: Structure/Function Correlation in Apolipoproteins, (2012) In Protein Interaction/Book 2, In Tech – Open Acces Publisher.
90. Dergunov AD. Local/bulk determinants of conformational stability of exchangeable apolipoproteins, *Biochim. Biophys. Acta* 1814 (2011) 1169-1177.

91. Marcel YL, Kiss RS. Structure-function relationships of apolipoprotein A-I: a flexible protein with dynamic lipid associations, *Curr. Opin. Lipidol.* 14 (2003) 151-157.
92. Brouillette CG, Anantharamaiah GM, Engler JA, Borhani DW. Structural models of human apolipoprotein A-I: a critical analysis and review, *Biochim. Biophys. Acta* 1531 (2001) 4-46.
93. Narayanaswami V, Ryan RO. Molecular basis of exchangeable apolipoprotein function, *Biochim. Biophys. Acta* 1483 (2000) 15-36.
94. Rothblat GH, Mahlberg FH, Johnson WJ, Phillips MC. Apolipoproteins, membrane cholesterol domains, and the regulation of cholesterol efflux, *J. Lipid. Res.* 33 (1992), 1091-1097.
95. Burgess JW, Frank PG, Franklin V, Liang P, McManus DC, *et al.* Deletion of the C-terminal domain of apolipoprotein A-I impairs cell surface binding and lipid efflux in macrophage, *Biochemistry* 38 (1999) 14524-14533.
96. Rogers DP, Roberts LM, Lebowitz J, Engler JA, Brouillette CG. Structural analysis of apolipoprotein A-I: effects of amino- and carboxy-terminal deletions on the lipid-free structure, *Biochemistry* 37 (1998) 945-955.
97. Rogers DP, Brouillette CG, Engler JA, Tendian SW, Roberts L, *et al.* Truncation of the amino terminus of human apolipoprotein A-I substantially alters only the lipid-free conformation, *Biochemistry* 36 (1997) 288-300.
98. Davidson WS, Hazlett T, Mantulin WW, Jonas A. The role of apolipoprotein AI domains in lipid binding, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93 (1996) 13605-13610.
99. Holvoet P, Zhao Z, Vanloo B, Vos R, Deridder E, *et al.* Phospholipid binding and lecithin-cholesterol acyltransferase activation properties of apolipoprotein A-I mutants, *Biochemistry* 34 (1995) 13334-13342.
100. Schmidt HH, Remaley AT, Stonik JA, Ronan R, Wellmann A, *et al.* Carboxyl-terminal domain truncation alters apolipoprotein A-I in vivo catabolism, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 5469-5475.
101. 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.* 73 (1997) 2337-2346.
102. Brouillette CG, Anantharamaiah GM. Structural models of human apolipoprotein A-I, *Biochim. Biophys. Acta* 1256 (1995) 103-129.
103. Ji Y, Jonas A. Properties of an N-terminal proteolytic fragment of apolipoprotein AI in solution and in reconstituted high density lipoproteins, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 11290-11297.
104. Biedzka-Sarek M, Metso J, Kateifides A, Meri T, Jokiranta TS, *et al.* Apolipoprotein A-I exerts bactericidal activity against *Yersinia enterocolitica* serotype O:3, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 38211-38219.
105. Kelly BA, Harrison I, McKnight A, Dobson CB. Anti-infective activity of apolipoprotein domain derived peptides in vitro identification of novel antimicrobial peptides related to apolipoprotein B with anti-HIV activity, *BMC Immunol.* (2010)11:13.
106. Berbée JFP, van der Hoogt CC, Kleemann R, Schippers EF, Kitchens RL, *et al.* Apolipoprotein CI stimulates the response to lipopolysaccharide and reduces mortality in Gram-negative sepsis, *FASEB J.* 20 (2006) E1560-E1569.
107. Lagerstedt JO, Cavigliolo G, Roberts LM, Hong HS, Jin LW, *et al.* Mapping the structural transition in an amyloidogenic apolipoprotein A-I, *Biochemistry* 46 (2007) 9693-9699.
108. de Sousa MM, Vital C, Ostler D, Fernandes R, Pouget-Abadie J, *et al.* Apolipoprotein AI and transthyretin as components of amyloid fibrils in a kindred with apoAI Leu178His amyloidosis, *Am. J. Pathol.* 156 (2000) 1911-1917.
109. Hamidi Asl L, Liepnieks JJ, Hamidi Asl K, Uemichi T, Moulin G, *et al.* Hereditary amyloid cardiomyopathy caused by a variant apolipoprotein A1, *Am. J. Pathol.* 154 (1999) 221-227.
110. Persey MR, Booth DR, Booth SE, van Zyl-Smit R, Adams BK, *et al.* Hereditary nephropathic systemic amyloidosis caused by a novel variant apolipoprotein A-I, *Kidney Int.* 53 (1998) 276-281.
111. Booth DR, Tan SY, Booth SE, Tennent GA, Hutchinson WL, *et al.* Hereditary hepatic and systemic amyloidosis caused by a new deletion/insertion mutation in the apolipoprotein AI gene, *J. Clin. Invest.* 97 (1996) 2714-2721.
112. Booth DR, Tan SY, Booth SE, Hsuan JJ, Totty NF, *et al.*, A new apolipoprotein AI variant, Trp50Arg, causes hereditary amyloidosis, *Q. J. Med.* 88 (1995) 695-702.
113. Soutar AK, Hawkins PN, Vigushin DM, Tennent GA, Booth SE, *et al.* Apolipoprotein AI mutation Arg-60 causes autosomal dominant amyloidosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 89 (1992) 7389-7393.
114. Nichols WC, Gregg RE, Brewer HB Jr, Benson MD. A mutation in apolipoprotein A-I in the Iowa type of familial amyloidotic polyneuropathy, *Genomics* 8 (1990) 318-323.
115. Westermarck P, Mucchiano G, Marthin T, Johnson KH, Sletten K. Apolipoprotein A1-derived amyloid in human aortic atherosclerotic plaques, *Am. J. Pathol.* 147 (1995) 1186-1192.
116. Marchesi M, Parolini C, Valetti C, Mangione P, Obici L, *et al.* The intracellular quality control system down-regulates the secretion of amyloidogenic apolipoprotein A-I variants: A possible impact on the natural history of the disease, *Biochim. Biophys. Acta* 1812 (2011) 87-93.

117. Das M, Mei X, Jayaraman S, Atkinson D, Gursky O. Amyloidogenic mutations in human apolipoprotein A-I are not necessarily destabilizing – a common mechanism of apolipoprotein A-I misfolding in familial amyloidosis and atherosclerosis. *FEBS J.* 11 (2014) 2525-2542.
118. Ramella NA, Rimoldi OJ, Prieto ED, Schinella GR, Sanchez SA, *et al.* Human apolipoprotein A-I-derived amyloid: its association with atherosclerosis, *PlosOne* 6 (2011) e22532.
119. Varkey J, Isas JM, Mizuno N, Jensen MB, Bhatia VK, *et al.* Membrane curvature induction and tubulation are common features of synucleins and apolipoproteins, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 32486-32493.
120. Gellermann GP, Appel TR, Tannert A, Radestock A, Hortschansky P, *et al.* Raft lipids as common components of human extracellular amyloid fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 102 (2005) 6297-6302.
121. McLaurin J, Darabie AA, Morrison MR. Cholesterol, a modulator of membrane-associated A $\beta$ -fibrillogenesis, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 977 (2002) 376-383.
122. Yanagisawa K, Matsuzaki K. Cholesterol-dependent aggregation of amyloid beta-protein, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 977 (2002) 384-386.
123. Mendoza-Espinosa P, Garcia-Gonzalez V, Moreno A, Castillo R, Mas-Oliva J. Disorder-to-order conformational transitions in protein structure and its relationship to disease, *Mol. Cell. Biochem.* 330 (2009) 105-120.
124. Hatters DM, Lawrence LJ, Howlett GJ. Sub-micellar phospholipid accelerates amyloid formation by apolipoprotein C-II. *FEBS Lett.* 494 (2001) 220-224.
125. Bryson JW, Betz SF, Lu HS, Suich DJ, Zhou HX, *et al.* Protein Design: A hierarchic approach, *Science* 270 (1995) 935-941.
126. Kamtekar S, Schiffer JM, Xiong H, Babik JM, Hecht MH. Protein design by binary patterning of polar and nonpolar amino acids, *Science* 262 (1993) 1680-1685.
127. Hecht MH, Richardson JS, Richardson DC, Ogden RC. De novo design, expression, and characterization of Felix: a four-helix bundle protein of native-like sequence. *Science* 249 (1990) 884-891.
128. Quinn TP, Tweedy NB, Williams RW, Richardson JS, Richardson DC. Betadoublet: de novo design, synthesis, and characterization of a beta-sandwich protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 91 (1994) 8747-8751.
129. Wells JA. Binding in the growth hormone receptor complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93 (1996) 1-6.
130. Wrighton NC, Farrell FX, Chang R, Kashyap AK, Barbone FP, *et al.* Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin, *Science* 273 (1996) 458-463.
131. Wells JA. Functional mimicry of a protein hormone by a peptide agonist: The EPO receptor complex at 2.8 Å, *Science* 273 (1996) 464-471.
132. Robertson DE, Farid RS, Christopher CM, Urbauer JL, Mulholland SE, *et al.* Design and synthesis of multi-haem proteins, *Nature* 368 (1994) 425-432.
133. Johansson K, Alleman RK, Widmer H, Benner SA. Synthesis, structure and activity of artificial, rationally designed catalytic polypeptides, *Nature* 365 (1993) 530-532.
134. Hahn KW, Klis WA, Stewart JM. Design and synthesis of a peptide having chymotrypsin-like esterase activity, *Science* 248 (1990) 1544-1547.
135. Cardenas-Aguayo MC, Kazim SF, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Neurogenic and neurotrophic effects of BDNF peptides in mouse hippocampal primary neuronal cell cultures, *PlosOne* 8 (2013) e53596.
136. Moebius K, Eichler J. HIV-derived peptide mimics, *Drug Discovery Today: Technologies* 6 (2009) e19-e25

**Estudio de transiciones desorden-  
orden en péptidos derivados de  
ApoC-I**

Tomado de:

*Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2008) 365, 8-15

### Resumen

En nuestro laboratorio usando monocapas de Langmuir de apolipoproteínas previamente se ha demostrado que posterior a una compresión lateral en interfases aire/agua así como fosfolípido/agua, existe un movimiento importante del segmento C-terminal de la ApoC-I hacia el aire, considerado como la región hidrofóbica de la monocapa y hacia la región de las cadenas acilo cuando se usan fosfolípidos. En este trabajo exploramos los cambios de estructura secundaria que podrían ocurrir dentro del segmento carboxilo terminal de la ApoC-I y otros dos péptidos de esta misma proteína en presencia de lisofosfolípidos. Nuestros resultados indican que solo determinados lisofosfolípidos pueden modular estas transiciones desorden-orden al generar pequeños agregados de lípido/péptido cuyo diámetro es menor a 10 nm.

### Introducción

Como una alternativa al modelo de dos estados para estudiar la desnaturalización de una proteína, se ha reportado la existencia de intermediarios parcialmente desplegados entre el estado ordenado y desestructurado [1]. Estos intermediarios del plegamiento han mostrado ser estructuras compactas, que poseen algunos segmentos desestructurados en comparación con sus estados ordenados. Esto se comprobó experimentalmente primero mediante viscosidad intrínseca y después se confirmó por dispersión dinámica de luz [2]. Una interpretación del estado parcialmente desplegado originó el término “glóbulo fundido”, donde la proteína se convierte de un estado ordenado o nativo a uno con características conocidas como estado líquido [1]. En contraste a esta visión donde la función recae estrictamente en la estructura tridimensional o cambios en ésta para generar estructuras alternativas,

actualmente se cuenta con importantes ejemplos en los cuales segmentos no estructurados de proteínas juegan un importante papel en su función [2,3]. A este respecto, las transiciones desorden-orden que pueden potencialmente generar un acoplamiento con mayor especificidad, pero de menor afinidad, en el complejo proteína-proteína o proteína-ligando han sido ampliamente reconocidas. Este fenómeno se basa, principalmente en el hecho, de que mediante transiciones de tipo desorden-orden se generan restricciones estéricas, lo cual permite aumentar el número de interacciones entre superficies de complejos proteína-proteína que no podrían obtenerse de sus contrapartes rígidas [4]. A pesar de la extraordinaria importancia de estas transiciones, todavía se carece de estudios biofísicos que relacionen este tipo de organización desorden-orden con la función de una proteína.

Por lo tanto, con la intención de abordar la posibilidad de que estas transiciones de estructura puedan explicar cuestiones básicas como el reconocimiento de receptor, transferencia de lípido y la capacidad de auto intercambiarse realizado por varias apolipoproteínas, nuestro grupo ha dirigido sus esfuerzos directamente a medir cambios conformacionales de apolipoproteínas en interfases aire/agua y lípido/agua para aproximarse a posibles mecanismos que puedan explicar estos fenómenos. Esto ha sido conseguido empleando monocapas de Langmuir en conjunto con microscopía de ángulo de Brewster (MAB), microscopía de fuerza atómica (MFA) y películas Langmuir Blodgett (LB) de proteína [5-8], difracción de rayos X de ángulo incidente en monocapas de proteína [9] y mediciones de fuerza de superficie [10]. Mediante la aplicación de las técnicas anteriormente mencionadas no es posible determinar si la estructura secundaria de segmentos específicos de las apolipoproteínas C-I y A-II (ApoC-I y ApoA-II) permanecen estables independientemente de su posición en la interfase aire/agua y lípido/agua. Por lo anterior se pensó en la posibilidad de que

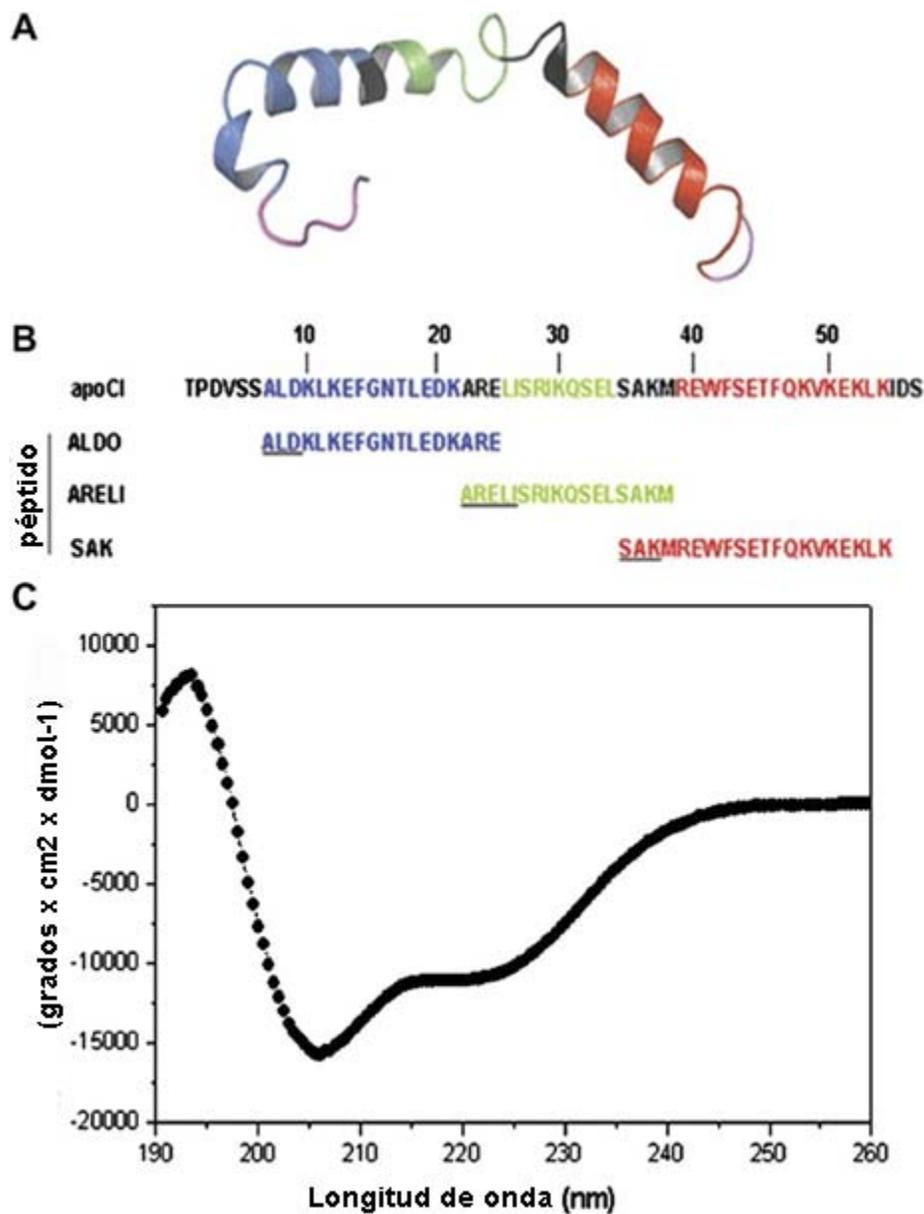
estos segmentos respondieran de manera específica a cambios en el microambiente circundante y de esta manera generar transiciones desorden-orden.

Debido a su composición, la ApoC-I plasmática exhibe el pI más alto entre las proteínas asociadas a la HDL. La ApoC-I inhibe a la fosfolipasa A2 y la lipasa hepática [11,12] y activa LCAT [13]. También se ha reportado que los fragmentos N-terminal (aminoácidos 1T-38M) de la ApoC-I actúan como un inhibidor *in vitro* de CETP [14]. Adicionalmente, se encontró que la ApoC-I es el más potente inhibidor de la interacción entre la lipoproteína VLDL tipo  $\beta$  (VLDL- $\beta$ ), y la proteína relacionada con el receptor de lipoproteína (LRP) [15]. Nosotros pensamos que una proteína puede tener segmentos desordenados, los cuales solo responden y adquieren una estructura secundaria cuando se unen a ligandos específicos.

De acuerdo a nuestra hipótesis, el segmento C-terminal de la ApoC-I podría ser desplazado dependiendo del grado de compactación y tamaño en la HDL [16]. Este estudio propone la posibilidad de que segmentos no estructurados en el dominio C-terminal de la ApoC-I embebidos en un ambiente hidrofóbico al ser desplazados a una interfase hidrofílica/hidrofóbica presentan transiciones de tipo desorden-orden. La adquisición de conformaciones lípido-específicas en la ApoC-I puede proveer de nuevos conocimientos en el mecanismo por el cual esta proteína modula su función, es decir una modulación proteína/enzima y el autointercambio entre partículas proteicas. Este mecanismo podría comenzar a explicar la plasticidad conformacional y propiedades moduladoras ejercidas por esta proteína sobre otras proteínas en la superficie de la HDL.

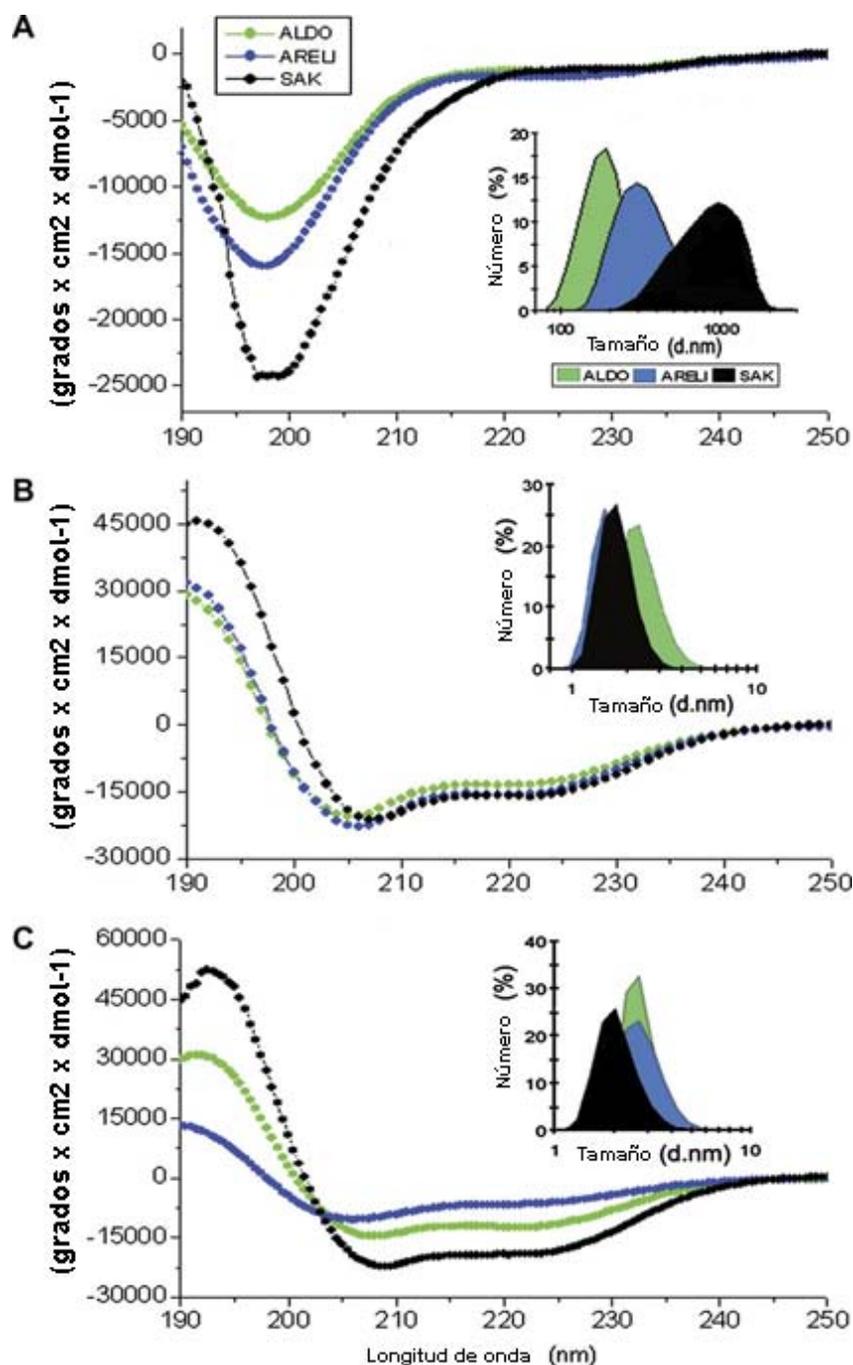
## **Resultados y discusión**

Con base en trabajos previos realizados por nuestro grupo en donde empleamos monocapas de Langmuir de ApoC-I, se propone que el segmento C-terminal de esta proteína desorbe de la interfase aire/agua así como lípido/agua en respuesta a presión lateral. Con la finalidad de conocer la estructura de los diferentes segmentos de la ApoC-I en estas condiciones, se decidió abordar el problema mediante el estudio de la estructura de péptidos derivados de esta apolipoproteína. Los péptidos se diseñaron en función de su valor de  $\mu\text{H}$ , secuencia de aminoácidos y su capacidad de desorción observadas en las monocapas de Langmuir, los cuales fueron nombrados como ALDO<sup>(7-24)</sup>, ARELI<sup>(22-38)</sup> y SAK<sup>(35-53)</sup> (Fig. 1A y 1B).



**Fig. 1.** Estructura de ApoC-I. A) Estructura ApoC-I definida a partir de un experimento de resonancia magnética nuclear (RMN) [18]. B) El código de color muestra la posición de los péptidos en la estructura y la secuencia: ALDO<sup>(7-23)</sup>, ARELI<sup>(22-38)</sup>, y SAK<sup>(35-54)</sup>. (C) Espectro de DC de ApoC-I en solución (agua MilliQ).

En trabajos previos se observó que la ApoC-I presenta una señal de DC asociada a un alto grado de estructura hélice- $\alpha$  en amortiguador de fosfatos [5] así como en solución acuosa (Fig.1C). Sin embargo, los péptidos ALDO<sup>(7-23)</sup>, ARELI<sup>(22-38)</sup> y SAK<sup>(35-54)</sup> cuando se probaron en las mismas condiciones experimentales se observaron completamente desestructurados a cualquier pH, temperatura y fuerza iónica. Sin embargo, es interesante notar que independientemente de su carácter anfipático y altos valores de  $\mu H$  (sobre 0.315 kcal/mol), que los hacen candidatos factibles para formar estructuras de tipo hélice- $\alpha$ , permanecen sin estructura secundaria en solución acuosa. Solo después de la adición de cantidades crecientes de SDS o trifluoroetanol (TFE), su espectro de DC muestra claramente una señal con un doble mínimo en 208 y 222 nm y un máximo en 195 nm, indicativo de la formación de una hélice- $\alpha$  con cada uno de los péptidos probados (Fig. 2A). El espectro obtenido en presencia de SDS muestra la generación de un punto isodicroico a 203 nm, lo cual es indicativo de la existencia de solo dos especies moleculares que corresponden a la forma plegada en hélice- $\alpha$  y sin estructura determinada respectivamente. De manera interesante el estudio por DLS reveló que todos los péptidos en solución, que no presentan elementos de estructura secundaria generan agregados de gran tamaño (inserto, Fig. 2A). En cuanto se añade un 40% de TFE, los péptidos recobran un porcentaje muy importante de estructura hélice- $\alpha$  y mediante DLS se observó que se generan agregados de menor tamaño (inserto, Fig. 2B;). Las soluciones de SDS por abajo y por arriba de su concentración micelar crítica (CMC), promueve transiciones de tipo desorden-orden así como la formación de pequeños agregados (inserto, Fig. 2C).



**Fig. 2.** Espectros de DC en UV lejano de los péptidos derivados de ApoC-I. (A) Espectros registrados en solución acuosa para los péptidos ALDO<sup>(7-23)</sup>, ARELI<sup>(22-38)</sup> y SAK<sup>(35-54)</sup>. (B) En presencia de 40% TFE. (C) En presencia de SDS (20 mM). Insertos: Análisis de diámetro de partícula por DLS.

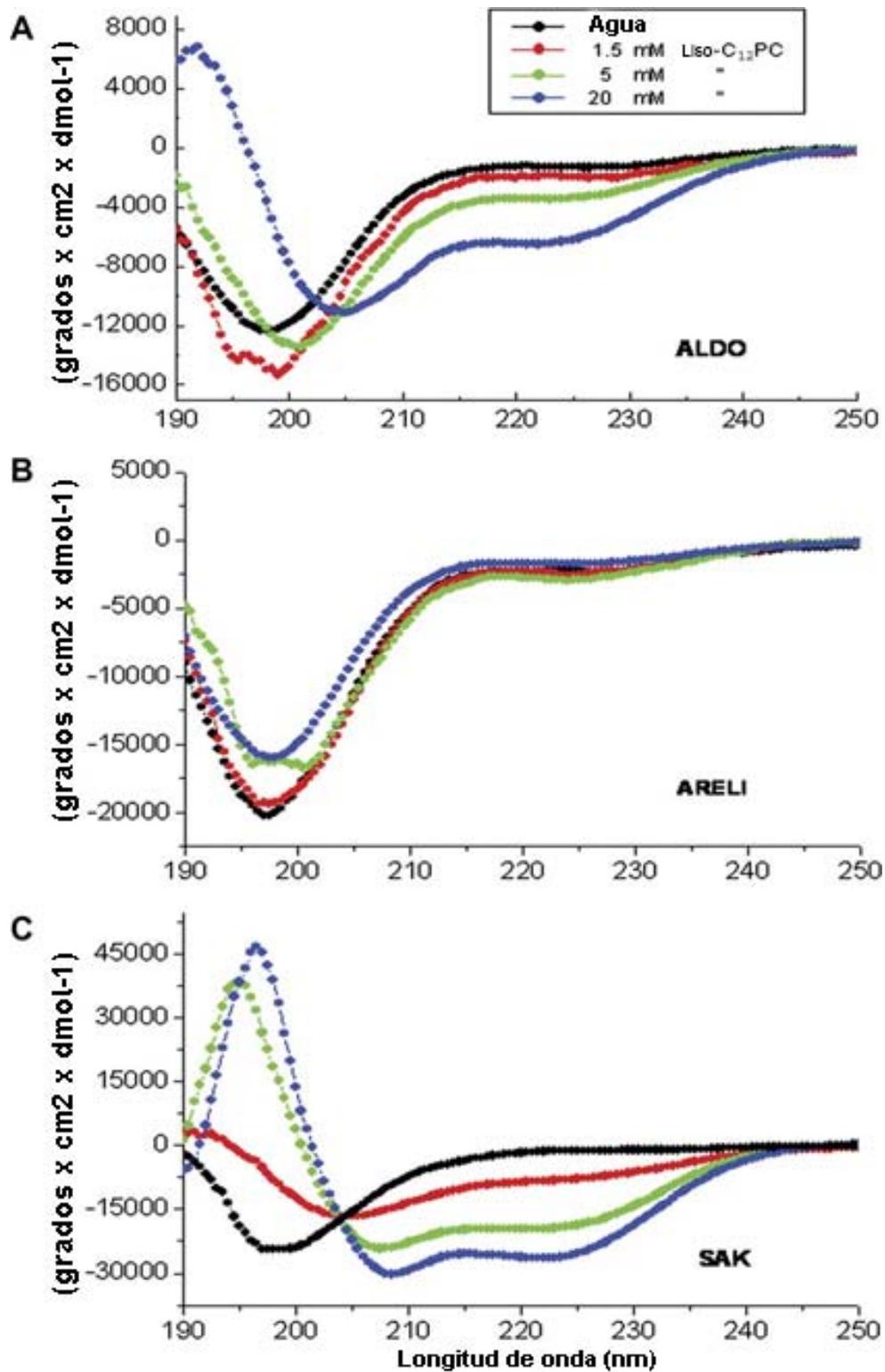
Estos experimentos indican que todos los péptidos derivados de la ApoC-I tienden a formar agregados grandes en su forma desplegada y solo adquiere un estado no agregado, así como una conformación de hélice- $\alpha$  en presencia de una interfase hidrofóbica/hidrofílica. Con la finalidad de probar el efecto de lípidos específicos en las transiciones desorden-orden de los péptidos ALDO<sup>(7-23)</sup>, ARELI<sup>(22-38)</sup> y SAK<sup>(35-54)</sup>, se incorporaron a la solución una serie de fosfolípidos y moléculas miméticas a ambientes lipídicos por encima y por debajo de su CMC. Estas soluciones posteriormente se estudiaron mediante DC.

Como ya se observó previamente los péptidos ALDO<sup>(7-23)</sup>, ARELI<sup>(22-38)</sup> y SAK<sup>(35-54)</sup> en condiciones donde no presentan una estructura secundaria definida en agua cambian de forma gradual hacia una conformación de hélice- $\alpha$ , mediante cantidades incrementadas de TFE y SDS. Los péptidos en estudio adquieren un contenido de aproximadamente un 86% de estructura hélice- $\alpha$  cuando se adiciona un 80% de TFE al medio. Interesantemente al incorporar a la solución de péptido el SDS (1.5-20 mM), que es una molécula con una estructura similar a la de los fosfolípidos, se observó un recobro de estructura secundaria en todos los péptidos. En estas condiciones el péptido SAK<sup>(35-53)</sup> siempre presenta el mayor porcentaje de estructura hélice- $\alpha$  y el péptido ARELI<sup>(22-38)</sup> el menor, independientemente de la concentración de SDS de la solución.

Con la finalidad de trabajar usando soluciones claras durante las determinaciones de DC, preparamos concentraciones adecuadas por arriba y por debajo de la CMC de fosfolípidos como fosfatidilcolina (PC del inglés *phosphatidylcholine*) y 1-2-dihexanoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DHPC). Se observó que solo el péptido SAK<sup>(35-53)</sup> en presencia del DHPC en concentraciones por arriba y por debajo de su CMC genera espectros característicos de una estructura hélice- $\alpha$ .

Estos resultados nos muestran la importancia de la composición del medio para generar transiciones de tipo desorden-orden, por esta razón decidimos probar con una molécula como el colesterol que es altamente hidrofóbica. Se adicionaron pequeñas cantidades de colesterol a mezclas de fosfolípido-agua para explorar si esta combinación generaba un cambio en los porcentajes de hélice- $\alpha$  obtenidos. Con estos ensayos encontramos que la interacción DHPC-colesterol no generó cambios en la estructura de los péptidos observados en presencia de fosfolípido. Posteriormente cuando se probó con lisofosfolípidos cuya estructura es semejante a la molécula de SDS, dependiendo de la longitud de su cadena acílica y la concentración empleada en solución, pudimos observar cambios importantes específicamente con el péptido SAK<sup>(35-53)</sup>. Por otro lado, se observó que el lisofosfolípido Liso-C<sub>6</sub>PC solo por arriba de su CMC generó cambios discretos en la estructura secundaria de los péptidos analizados mediante DC. Solamente el lisofosfolípido Liso-C<sub>12</sub>PC, el cual presenta una cadena larga de ácido graso indujo una transición desorden-orden en los tres péptidos estudiados. En el caso del péptido ALDO<sup>(7-24)</sup> en la concentración más alta de Liso-C<sub>12</sub>PC se observó un cambio importante de estructura secundaria (Figs. 3A-C)

La transición observada con SAK<sup>(35-53)</sup> en presencia de lisofosfolípido Liso-C<sub>12</sub>PC resultó ser más eficiente que en presencia de SDS y fue cercana al efecto observado cuando se añadió 80% TFE al medio. Una vez más, en comparación con la transición que observamos con SDS, el péptido SAK<sup>(35-53)</sup> mostró ser el péptido más sensible a Liso-C<sub>12</sub>PC en comparación de ALDO<sup>(7-24)</sup> y ARELI<sup>(22-38)</sup>. De manera interesante, los resultados observados de DLS con todos los péptidos en solución acuosa, indican que el Liso-C<sub>6</sub>PC, es un lípido que no es capaz de generar una transición desorden-orden en concentraciones inferiores a su CMC, manteniendo todos los péptidos en un estado desordenado, inclusive promueve la formación de estructuras macromoleculares con diámetros mucho mayores en la proteína soluble.



**Fig. 3.** DC en UV lejano de péptidos de péptidos derivados de ApoC-I en presencia de Liso-C<sub>12</sub>PC; (A) ALDO<sup>(7-24)</sup>; (B) ARELI<sup>(22-38)</sup>; (C) SAK<sup>(35-53)</sup>.

De acuerdo con nuestros resultados publicados, la mayoría de las apolipoproteínas intercambiables independientemente de sus diferencias en longitud y número de segmentos hélice- $\alpha$  anfipáticos, cuando se colocan en monocapas en una interfase aire / agua, muestran un importante cambio conformacional después de ejercer una compresión lateral [5-9]. A pesar de que estos experimentos indicaron que todas las apolipoproteínas intercambiables que hemos estudiado limitan su estructura a permanecer principalmente en la interfase, hay pruebas de que algunos de sus segmentos hélice- $\alpha$ , una vez que se aplica una presión lateral a la monocapa de la proteína, se desorben de la interfase hacia el aire [5-8].

Nuestros datos develaron una propiedad interesante de las monocapas de Langmuir binarias las cuales estuvieron compuestas de una mezcla de fosfolípido/apolipoproteína en una interfase agua/lípido. En estos experimentos se observó que la ApoC-I cuando se inyecta en la subfase, se mueve hacia esta interfase de una manera rápida y después de la compresión lateral su hélice del segmento C-terminal penetra en la monocapa [8]. Cuando se libera la presión lateral, este segmento se incorpora de nuevo en la interfase lípido/agua. Nuestros experimentos donde se utilizaron los mismos fosfolípidos empleados en la generación de las monocapas de Langmuir y con los cuales no observamos la formación de una estructura definida en el péptido SAK, indican que probablemente el segmento C-terminal de ApoC-I no presenta una estructura definida al penetrar la monocapa. A partir de los trabajos previos del laboratorio y los experimentos llevados a cabo durante el presente estudio se propuso un mecanismo para explicar la interacción de ApoC-I con la superficie de la HDL. En el cual, la ApoC-I en la superficie de una HDL

discoidal presentaría la misma conformación que se observó en la monocapa de Langmuir aplicando una presión lateral. El segmento C-terminal de la ApoC-I se encontraría insertado y sin estructura en la membrana de fosfolípidos que componen la HDL discoidal, el resto de la proteína permanecería sobre la superficie de esta partícula. Durante su paso por el torrente sanguíneo, la HDL discoidal adquiere una forma esférica lo cual provee de una disminución de presión lateral en la superficie de la lipoproteína. En respuesta a este cambio en la superficie de la HDL, el segmento C-terminal de ApoC-I originalmente incrustado en la monocapa de fosfolípido se mueve hacia la interfaz polar/no polar de la HDL cambiando a una estructura helicoidal. Se sabe que la superficie de las membranas celulares y de la HDL asocian lípidos como el Liso-C<sub>12</sub>PC, lo cual podría inducir una clara transición a una estructura hélice- $\alpha$  en el segmento C-terminal de ApoC-I al quedar expuesto en la superficie de esta lipoproteína.

Estas transiciones estructurales también están asociadas a moléculas biológicamente activas tales como la esfingosina-1-fosfato y lisosulfátido. Se ha observado que estas moléculas cuando se asocian a las partículas de HDL, promueven varios efectos anti-inflamatorios y por lo tanto se propone que tienen un papel potencial ateroprotector [19]. Los ésteres de colesterol se forman por acción de la enzima LCAT situada en la superficie de las partículas de HDL, para lo cual se promueve la transferencia de un grupo acilo graso de la posición dos de la fosfatidilcolina al colesterol, con la consiguiente síntesis de lisofosfatidilcolina. Esto hace posible la presencia de nuevos grupos OH en la interfase polar/no polar y que cambien las propiedades electrostáticas de la interfase. Estos cambios localizados en la estructura secundaria de varias proteínas [20-22] se han propuesto para explicar en casos específicos activación enzimática [28] así como procesos de plegamiento [24].

## **Conclusiones**

Este estudio propone que los cambios estructurales observados en péptidos derivados de ApoC-I en presencia de lípidos específicos, pueden explicar cómo se modula la estructura de la proteína completa en la superficie de la HDL. Estos cambios podrían ser los mecanismos por los cuales la ApoC-I modula el reconocimiento proteína/proteína, relacionados directamente con la activación de enzimas involucradas con el remodelamiento lipídico mientras está asociada a la superficie de la HDL. El cambio conformacional dependiente de lípidos en las diferentes apolipoproteínas podría ser un mecanismo general para mediar la activación enzimática y transporte de lípidos. Sin duda, una investigación más profunda sobre este posible mecanismo que permite promover cambios conformacionales localizados en la estructura de las apolipoproteínas, aportará avances en el conocimiento de su función.

## **Perspectivas**

El siguiente paso es abordar como estas transiciones desorden-orden pueden ser capaces de activar o inhibir enzimas, así como interaccionar con receptores de membrana. Este problema será abordado en el siguiente capítulo con un estudio de péptidos derivados de sitios clave de ApoA-I y su efecto en la activación de la enzima LCAT.

## **Materiales y métodos**

*Síntesis y preparación de los péptidos:* Los péptidos fueron diseñados a partir de la secuencia reportada para la ApoC-I en función de sus propiedades fisicoquímicas y estructurales: ALDO<sup>(7-24)</sup>, ARELI<sup>(22-38)</sup> y SAK<sup>(35-53)</sup>. Los péptidos se adquirieron con la compañía *Peptido Genic Research* como liofilizados con una pureza del 95%. Estos péptidos se disolvieron en agua a 1 mg/ml y posteriormente se prepararon diluciones con agua, SDS o TFE para obtener una concentración final de 200 µg/mL del péptido.

*Preparación de los lípidos:* PC, colesterol (SIGMA), DHPC, Liso-C<sub>6</sub>PC, Liso-C<sub>12</sub>PC (Avanti Lipids). Estos lípidos en su forma comercial, con excepción del colesterol, se encuentran disueltos en cloroformo. Con estos compuestos se prepararon soluciones por arriba y por debajo de su CMC.

*Preparación de las muestras:* Los péptidos fueron incubados con los diferentes lípidos a varias concentraciones, 20 mM de SDS o 40% v/v de TFE durante 12 h a temperatura ambiente antes de su caracterización mediante DC y DLS.

*Dicroísmo Circular (DC):* El equipo empleado fue un espectropolarímetro AVIV62DS (AVIV Instruments) a 25°C utilizando longitudes de onda en el UV lejano (190-250 nm) y una celda con un paso de luz de 1.0 mm. Los espectros de DC se generaron con un ancho de banda de 1 nm, incrementos de 0.5-1 nm y 2-5 registros.

*Dispersión dinámica de luz (DLS)*: El análisis de DLS para cada muestra se realizó inmediatamente después de las mediciones de DC empleando un equipo Malvern Zetasizer Nano System a 25°C. La intensidad de la luz dispersada fue medida en un ángulo de 173°.

## Referencias

1. Dolgikh DA, Gilmanshin RI, Brazhnikov EV, Bychkova VE, Semisotnov GV, *et al.*  $\alpha$ -Lactalbumin: compact state with fluctuating tertiary structure? *FEBS Lett.* 136 (1981) 311-315.
2. Bloomer AC, Champness JN, Bricogne G, Staden R, Klug A. Protein disk of tobacco mosaic virus at 2.8 Å resolution showing the interactions within and between subunits, *Nature* 276 (1978) 362-368.
3. Bode W, Schwager P, Huber R. The transition of bovine trypsinogen to a trypsin-like state upon strong ligand binding. The refined crystal structures of the bovine trypsinogen-pancreatic trypsin inhibitor complex and of its ternary complex with Ile-Val at 1.9 Å resolution, *J. Mol. Biol.* 118 (1978) 99-112.
4. [Xie Q, Arnold GE, Romero P, Obradovic Z, Garner E, Dunker AK. The sequence attribute method for determining relationships between sequence and protein disorder, *Genome Inform.* 9 (1998) 193-200.
5. Bolaños-García VM, Mas-Oliva J, Ramos S, Castillo R. Phase transitions in monolayers of human apolipoprotein C-I, *J. Phys. Chem. B* 103 (1999) 6236-6242.
6. 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* 105 (2001) 5757-5765.
7. Mas-Oliva J, Moreno A, Ramos S, Xicohtencatl-Cortés J, Campos J, Castillo R. in: N.S. Dhalla *et al.* (Eds.), *Frontiers in Cardiovascular Health*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2003, pp. 341-352.
8. Xicohtencatl-Cortés J, Castillo R, Mas-Oliva J. Phase transitions of phospholipid monolayers penetrated by apolipoproteins, *J. Phys. Chem. B* 108 (2004) 7307-7315.
9. J. Ruíz-García, A. Moreno, G. Brezesinski, H. Möhwald, J. Mas-Oliva, R. Castillo, Phase transitions and conformational changes in monolayers of human apolipoproteins C-I and A-II, *J. Phys. Chem. B* 107 (2003) 11117-11124.
10. J. Campos-Terán, J. Mas-Oliva, R. Castillo, Interaction and conformations of  $\alpha$ -helical human apolipoprotein C-I on hydrophobic and hydrophilic substrates, *J. Phys. Chem. B* 108 (2004) 20442-20450.
11. Conde-Knape K, Bensadoun A, Sobel JH, Cohn JS, Shachter NS. Overexpression of apoC-I in apoE-null mice: severe hypertriglyceridemia due to inhibition of hepatic lipase, *J. Lipid. Res.* 43 (2002) 2136-2145.
12. Kinnunen PK, Ehnolm C. Effect of serum and C apoproteins from very low density lipoproteins on human postheparin plasma hepatic lipase, *FEBS Lett.* 65 (1976) 354-357.
13. Soutar AK, Garner CW, Baker HN, Sparrow JT, Jackson RL, *et al.* Effect of the human plasma apolipoproteins and phosphatidylcholine acyl donor on the activity of lecithin: cholesterol acyl-transferase, *Biochemistry* 14 (1975) 3057-3064.
14. Gautier T, Masson D, de Barros JP, Athias A, Gambert P, Aunis D, Metz-Boutique MH, Lagrost L. Human apolipoprotein C-I accounts for the ability of plasma high density lipoproteins to inhibit the cholesteryl ester transfer protein activity, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 37504-37509.
15. Kowal RC, Herz J, Goldstein JL, Esser V, Brown MS. Low density lipoprotein receptor-related protein mediates uptake of cholesteryl esters derived from apoprotein E-enriched lipoproteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 86 (1989) 5810-5814.
16. Xicohtencatl-Cortés J, Castillo R, Mas-Oliva J. In search of new structural states of exchangeable apolipoproteins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324 (2004) 467-470.
17. Rozek A, Sparrow JT, Weisgraber KH, Cushley RJ. Sequence specific <sup>1</sup>H NMR resonance assignments and secondary structure of human apolipoprotein C-I in the presence of sodium dodecyl sulphate, *Biochem. Cell. Biol.* 76 (1998) 267-275.

18. Jerzy-Roch N, Assmann G. Atheroprotective effects of high-density lipoprotein-associated lysosphingolipids, *Trends. Cardiovasc. Med.* 15 (2005) 265–271.
19. Meador WE, Means AR, Quijcho FA. Target enzymes recognition by calmodulin: 2.4 Å structure of a camodulin-peptide complex, *Science* 257 (1992) 1251–1255.
20. Nolte RT, Conlin RM, Harrison SC, Brown RS. Differing roles for zinc fingers in DNA recognition: structure of a six-finger transcription factor IIIA complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95 (1998) 2938–2943.
21. Abel K, Yoder MD, Higenfeld R, Jurnak F. Stability of alpha helices, *Adv. Protein. Chem.* 49 (1995) 141–177.
22. Wei A, Rubin H, Cooperman BS, Christianson DW. Crystal structure of an uncleaved serpin reveals the conformation of an inhibitory reactive loop, *Nat. Struct. Biol.* 1 (1994) 251–258.
23. Hamada D, Segawa S, Goto Y. Non-native alpha-helical intermediate in the refolding of betalactoglobulin, a predominantly beta-sheet protein, *Nat. Struct. Biol.* 3 (1996) 868–873.

**Modulación de la actividad  
enzimática de LCAT por péptidos  
derivados de ApoA-I**

Tomado de:

*Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2013) 441, 469-475

### Resumen

El transporte de colesterol en el plasma y su remoción de tejidos periféricos depende de la actividad de la LCAT. Sin embargo, el detalle a nivel molecular de este proceso no se conoce. Por esta razón se investigó la forma en que cambios conformacionales en varias regiones expuestas de ApoA-I adosada a la HDL podrían generar la activación de LCAT. Como estrategia se diseñaron péptidos derivados de estos segmentos, los cuales corresponden a los dominios N y C-terminal de ApoA-I. Los experimentos de DC mostraron que los péptidos en solución acuosa permanecen sin una estructura definida pero en presencia de Liso-C<sub>12</sub>PC adquieren altos porcentajes de estructura hélice- $\alpha$ . Así mismo se estudió la actividad de la enzima LCAT en presencia de péptidos derivados de ApoA-I y se observó un importante incremento en la generación de éster de colesterol marcado. Como parte del estudio se realizaron análisis teóricos de la secuencia y estructura secundaria de los péptidos derivados de ApoA-I, observándose que comparten similitudes con péptidos antibacterianos que tienen la capacidad de disrumpir membranas.

### Introducción

La enzima LCAT es clave en la síntesis de la mayoría de los ésteres de colesterol del plasma [1,2]. Aunque se ha propuesto que es necesaria la asociación de ApoA-I con HDL para activar a LCAT [3,4], los mecanismos moleculares implicados no se conocen. Por lo tanto, en este estudio hemos investigado cómo los cambios conformacionales en varias regiones expuestas de ApoA-I podrían inducir la activación de LCAT. Con esta finalidad se diseñaron tres péptidos con base en la secuencia reportada de ApoA-I. Estos segmentos muestran una alta plasticidad

estructural y mediante nuestros análisis observamos que la presencia de una conformación hélice- $\alpha$  mejora la actividad de LCAT.

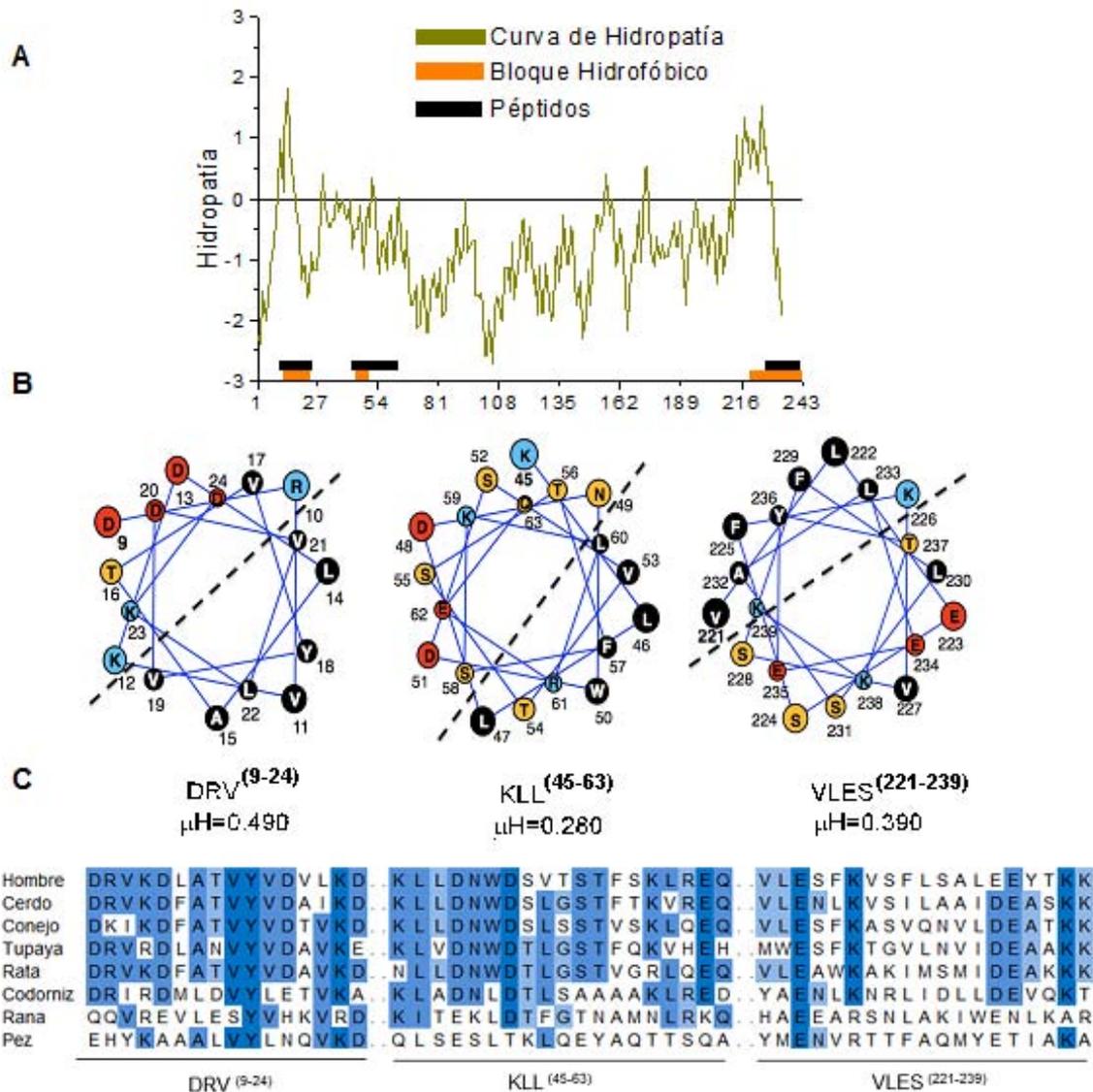
### **Interacción ApoA-I (HDL)/ LCAT**

La interacción de LCAT y la proteína ApoA-I adosada a la partícula HDL es un mecanismo que actualmente no está totalmente descrito debido a la plasticidad estructural de cada uno de los componentes de esta compleja interacción. Inclusive, actualmente no se han determinado el o los dominios de ApoA-I que permiten tanto la interacción como la activación de la enzima LCAT. Esta reacción requiere al menos tres pasos, i) LCAT se une al sustrato (HDL) y/o el activador, ii) LCAT hidroliza los ácidos grasos en la posición sn-2 del fosfolípido, iii) ocurre una trans-esterificación de colesterol y la concomitante liberación de éster de colesterol [5]. Se ha sugerido que los segmentos que corresponden a las hélices 1 y 10 de la ApoA-I, están directamente involucradas en la asociación con lípido y que probablemente se encargan de anclar LCAT a la superficie de la lipoproteína. A diferencia de las regiones N y C-terminales de la ApoA-I, la región central no posee propiedades importantes de unión a lípido y se ha propuesto como el sitio de activación para LCAT. En esta región se ha ubicado la presencia de tres argininas (149R, 153R, 160R) las cuales se consideran el sitio de interacción para la activación de LCAT [6]. Sin embargo, se ha observado una disminución importante de la actividad de esta enzima en presencia de mutantes de ApoA-I en los dominios N y C-terminal. Por otro lado, con base en varios estudios se sabe que los péptidos anfipáticos con un bloque hidrofóbico inclinado entre 60° y 30° grados muestran una relación estructura/función altamente especializada. Este tipo de péptidos también presentan una alta capacidad de interacción con membranas

lipídicas y el conjunto de las dos propiedades permite que puedan modular la actividad de algunas enzimas [7].

#### **Resultados y discusión**

Con la intención de conocer si las transiciones estructurales de ApoA-I podrían activar a LCAT, se realizó un análisis *in silico* de la ApoA-I y de péptidos derivados de su secuencia. En este análisis la ApoA-I mostró un perfil de hidrofobicidad con valores negativos presentes en las regiones N y C-terminales de la proteína (segmentos de aminoácidos 10R-17V y 213D-229F). Los valores positivos indican zonas hidrófobas los cuales se encontraron en tres grupos (13D-22L, 45K-49N y 216Q-232A) donde también se localizan los péptidos diseñados en este estudio (Fig. 1A). Este patrón de hidrofobicidad es compatible con la interacción entre ApoA-I y las partículas de HDL discoidales, donde el N y el C-terminal de ApoA-I son dominios de reconocimiento a lípido. Estudios previos han indicado que el N-terminal de la ApoA-I libre de lípido está involucrada en el control entre la estructura abierta y la estructura cerrada (forma de herradura), y que el C-terminal facilita su anclaje a membranas lipídicas [8,9]. Como parte del análisis fisicoquímico de estos péptidos, se estimó su anfifilicidad (Fig. 1B). El péptido DRV<sup>(9-24)</sup> presenta el valor de momento hidrofóbico más alto (490 kcal/mol), seguido de VLES<sup>(221-239)</sup> (0.390 kcal/mol) y KLL<sup>(45-63)</sup> (0.280 kcal/mol). Debido a que se encontraron valores de  $\mu H$  por arriba de 0.2 kcal/mol en cada uno de los péptidos se considera que presentan la capacidad de formar hélices- $\alpha$  de tipo anfipático. Mediante representaciones helicoidales se mostró que DRV<sup>(9-24)</sup> y VLES<sup>(221-239)</sup> presentaron una distribución más asimétrica de los aminoácidos polar y no polar que el péptido KLL<sup>(45-63)</sup>, confirmando de forma teórica que pertenecen al tipo de hélice- $\alpha$  anfipáticas



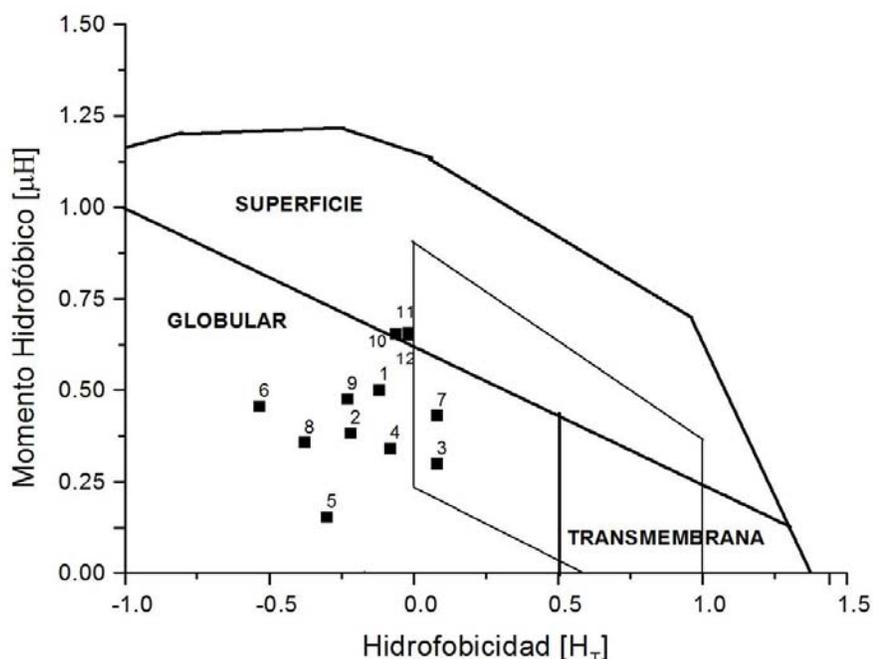
**Fig. 1.** Análisis fisicoquímico de ApoA-I y péptidos derivados de su secuencia (DRV<sup>(9-24)</sup>, KLL<sup>(45-63)</sup> y VLES<sup>(221-239)</sup>). (A) Perfil de hidrofobicidad y bloques hidrofóbicos (cuadros naranjas) se realizaron con los algoritmos Pepinfo [10] y HCA respectivamente [11]. (B) Representación de giro helicoidal de los péptidos DRV<sup>(9-24)</sup>, KLL<sup>(45-63)</sup> y VLES<sup>(221-239)</sup> con sus correspondientes valores de  $\mu H$ . La naturaleza anfipática de los péptidos se muestra con la línea que indica la interfase polar-no polar. Negro: residuos hidrofóbicos, azul:residuos básicos, rojo: residuos ácidos, amarillo: residuos polares sin carga. (C) Alineamiento de la secuencia de los péptidos DRV<sup>(9-24)</sup>, KLL<sup>(45-63)</sup> y VLES<sup>(221-239)</sup> con ortólogos en otras especies. La intensidad del color refleja el porcentaje de conservación del aminoácido.

En este estudio también se realizó un alineamiento de secuencias ortólogas para determinar si la secuencia de los péptidos estudiados aquí son conservados (Fig. 1C). Por otro lado, se realizó un estudio sobre la capacidad que presentan los péptidos para generar hélices- $\alpha$  orientados de forma oblicua en las membranas y a manera de comparación con otras secuencias que activan LCAT se muestra la Tabla 1. En este estudio observamos que el péptido VLES<sup>(221-239)</sup> es el único que presenta de forma teórica una inclinación en la membrana (Fig. 2). Los péptidos DRV<sup>(9-24)</sup> y KLL<sup>(45-63)</sup> presentan un parche hidrofóbico, pero no del tipo inclinado y a diferencia del péptido VLES<sup>(221-239)</sup>, presentan residuos de aminoácidos como la arginina, que se ha propuesto como facilitadora para la interacción con el sitio activo de la enzima LCAT.

**Tabla 1.** Secuencias de péptidos derivados de ApoA-I y modelos basados en su secuencia que ejercen o no un efecto en la función de la enzima LCAT.

NOMBRE	Función	SECUENCIAS	ApoA-I	H <sub>T</sub> kcal/mol	H <sub>FL</sub> kcal/mol	$\mu$ H
<sup>12</sup> DRV <sup>(9-24)</sup>	Activa LCAT	DRVVKDLATVYVDVLKD	9-24	-0.116	0.915	0.499
<sup>12</sup> KLL <sup>(45-63)</sup>		KLLDNWDSVTSTFSKLREQ	45-63	-0.215	1.043	0.381
<sup>12</sup> VLES <sup>(221-239)</sup>		VLESFKVSFLSALEEYTKK	221-239	0.084	0.923	0.297
<sup>13</sup> hélice-6	Activa LCAT	PLGEEMRDRARAHVDALRTHLA	143-164	-0.078	0.828	0.339
<sup>13</sup> hélice-7		PYSDELQRILAARLEALKENGG	165-186	-0.299	0.698	0.151
<sup>13</sup> hélice-6 AN	Péptido sintético que disminuye actividad	PLGEEMRDRARDHVDDLRDHLD	Modelo	-0.531	0.765	0.454
<sup>14</sup> LAP-20	Peptido sintético que activa LCAT	VSSLSSLKEYWSSLKESFS	Modelo	0.083	0.948	0.429
<sup>15</sup> [Arg <sup>13</sup> ]A-I <sub>con</sub>		PVLDEFREKLNERLEALKEKLLK	Modelo	-0.375	0.923	0.355
<sup>15</sup> [Ala <sup>13</sup> ]A-I <sub>con</sub>		PVLDEFREKLNEALEALKEKLLK	Modelo	-0.226	0.923	0.474
<sup>16</sup> ID3	Péptido sintético que no activa LCAT	LDDLQKWAEAFNQLLKK	Modelo	-0.054	0.949	0.653
<sup>16</sup> ID7		LNDLLQKWAELFNQLLKK	Modelo	-0.023	0.998	0.654
<sup>16</sup> ID9		LDNLLQKWAELFNQLLKK	Modelo	-0.023	0.998	0.649

<sup>10</sup> . En gris se marca los péptidos que podrían presentar una estructura hélice- $\alpha$  con una orientación oblicua en membranas. Superíndices: Refs.12,13,14,15,16. Los amino



**Fig. 2.** Análisis teórico de hélices- $\alpha$  orientadas de manera oblicua. El recuadro representa el área en el cual caen este tipo de hélices. (1)DRV<sup>(9-24)</sup>, (2)KLL<sup>(45-63)</sup>, (3)VLES<sup>(221-239)</sup>, (4)hélice-6, (5)hélice-7, (6)hélice-6 AN, (7)LAP-20, (8)[Arg<sup>13</sup>]A-I<sub>con</sub>, (9)[Ala<sup>13</sup>]A-I<sub>con</sub>, (10)ID3, (11)ID7, (12)ID9.

El gráfico de la Fig. 2. está basado en la representación de los puntos  $\mu H$  vs.  $H_T$  utilizando una ventana de 11 residuos pertenecientes a segmentos helicoidales de varias proteínas [17,18]. El área seleccionada para hélices- $\alpha$  orientadas de manera oblicua se generó en base a graficar datos de este tipo de secuencias [19]. El método aquí utilizado sirve para identificar secuencias candidato para posteriores investigaciones.

En este trabajo se realizó una caracterización fisicoquímica de los péptidos DRV<sup>(9-24)</sup>, KLL<sup>(45-63)</sup> y VLES<sup>(221-239)</sup> mediante experimentos de dicroísmo circular en medios acuosos y mimético a lípido. Se observó que a diferentes concentraciones (0.3, 0.6, 0.9 mg/mL) en amortiguador de fosfatos (pH 7.4) los péptidos presentan una

estructura desordenada. Por otro lado, utilizando las mismas concentraciones en presencia de Liso-C<sub>12</sub>PC (90 mM) los tres péptidos adquieren altos porcentajes de estructura secundaria. Así mismo se estudió el efecto de los péptidos DRV<sup>(9-24)</sup>, KLL<sup>(45-63)</sup> y VLES<sup>(221-239)</sup> en la actividad de la enzima LCAT. En este estudio se determinó la producción de [3H]-éster de colesterol en plasma, el cual fue utilizado como fuente de enzima natural. En este ensayo se probaron diferentes concentraciones de Liso-C<sub>12</sub>PC así como de péptido, conservando siempre un radio péptido/Liso-C<sub>12</sub>PC de 1:200 (mol:mol). Se observó que la concentración óptima de péptido fue de 0.9 mg/mL en 30 mM de Liso-C<sub>12</sub>PC independientemente de la secuencia del péptido. En promedio los péptidos DRV<sup>(9-24)</sup> y KLL<sup>(45-63)</sup> presentan un mayor efecto que el péptido VLES<sup>(221-239)</sup>.

### Conclusiones

El presente estudio provee información de gran importancia para elucidar el mecanismo por el cual la ApoA-I podría estar activando a la enzima LCAT. Nuestros resultados muestran que las transiciones desorden-orden de péptidos moduladas por el microambiente lipídico generan un aumento de actividad en la enzima LCAT con respecto al control. Un hallazgo sumamente importante fue encontrar que los sitios que se encuentran muy probablemente desordenados en la molécula de ApoA-I y que estudiamos aquí, por medio de péptidos generan transiciones de una estructura desordenada a una estructura hélice- $\alpha$  inducidas por un medio lipídico. Debido a características estructurales de los péptidos DRV<sup>(9-24)</sup> y KLL<sup>(45-63)</sup> generaron la mayor activación de la enzima LCAT en comparación del péptido VLES<sup>(221-239)</sup>.

## **Perspectivas**

Con estos resultados encontramos que efectivamente las transiciones desorden-orden pudieran ser los mecanismos por los cuales una sola secuencia peptídica podría activar diferentes tipos de enzimas así como interaccionar como es el caso de la ApoA-I con diferentes receptores. Sin embargo el detalle a nivel atómico de estas transiciones todavía queda lejos de poder determinarse mediante métodos experimentales, por esta razón consideramos importante realizar experimentos *in silico*. En el siguiente capítulo abordamos este problema con un péptido derivado del segmento C-terminal de CETP y también se muestra una metodología desarrollada para generar micelas. El poder modelar micelas con cualquier tipo de lípido nos ayudará a simular nuestros resultados experimentales y con ello avanzar hacia el establecimiento de un mecanismo a nivel atómico de las interacciones proteína-lípido que se dan en las lipoproteínas.

## **Métodos**

*Análisis in silico de ApoA-I y péptidos derivados de ApoA-I:* Para generar el perfil de hidrofobicidad se ocupó el algoritmo Pepinfo del servidor EMBOSS empleando una ventana de 9 aa [10]. Los bloques de segmentos hidrofóbicos en función de estructura secundaria se determinaron con el algoritmo HCA (del inglés *Hydrophobic Cluster Analysis*) del servidor Mobylye@RPBS[11]. El estudio de ortólogos de ApoA-I se realizó mediante múltiples alineamientos utilizando Clustal W 1.7 y la base de datos Pfam.

### Referencias

1. Glomset J, Wright J. Some properties of a cholesterol esterifying enzyme in human plasma, *Biochem. Biophys. Acta* 89 (1968) 266–276.
2. Wróblewska M, The origin and metabolism of a nascent pre-b-high density lipoprotein involved in cellular cholesterol efflux, *Acta Biochim. Pol.* 58 (2011) 275–285.
3. Fielding CJ, Shore VG, Fielding PE. A protein cofactor of lecithin cholesterol acyltransferase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46 (1972) 1493–1498.
4. Jonas A. Lecithin cholesterol acyltransferase, *Biochim. Biophys. Acta* 1529 (2000) 245–256.
5. Philippe G, Frank M, Yves LM. Apolipoprotein A-I: structure-function relationships, *J. Lipid. Res.* 41 (2000) 853–872.
6. Roosbeek S, Vanloo B, Duverger N, Caster H, Breyne J, *et al.* Three arginine residues in apolipoprotein A-I are critical for activation of lecithin:cholesterol acyltransferase, *J. Lipid. Res.* 42 (2001) 31–40.
7. Brandenburg K, Harris F, Dennison S, Seydel U, Phoenix D. Domain V of m-calpain shows the potential to form an oblique-orientated  $\alpha$ -helix, which may modulate the enzyme's activity via interactions with anionic lipid, *Eur. J. Biochem.* 269 (2002) 5414–5422.
8. Fang Y, Gursky O, Atkinson D. Lipid-binding studies of human apolipoprotein A-I and its terminally truncated mutants, *Biochemistry* 42 (2003) 13260–13268.
9. Kono M, Okumura Y, Tanaka M, *et al.*, Conformational flexibility of the N-terminal domain of apolipoprotein A-I bound to spherical lipid particles, *Biochemistry* 47 (2008) 11340–11347.
10. Pepinfo: [http://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss\\_pepinfo/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_pepinfo/)
11. HCA: <http://mobyle.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/portal.py?form=HCA#forms::HCA>
12. Aguilar-Espinosa SL, Mendoza-Espinosa P, Delgado-Coello B, Mas-Oliva J. Lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) activity in the presence of ApoA-I derived peptides exposed to disorder-to-order conformational transitions, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 441 (2013) 469–475.
13. Alexander ET, Bhat S, Thomas MJ, Weinberg RB, Cook VR, *et al.* Apolipoprotein A-I helix 6 negatively charged residues attenuate lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) reactivity, *Biochemistry* 44 (2005) 5409–5419.
14. Buchko GW, Treleaven WD, Dunne SJ, Tracey AS, Cushley RJ. Structural studies of a peptide activator of human lecithin-cholesterol acyltransferase, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 3039–3045.
15. Anantharamaiah GM, Venkatachalapathi YV, Brouillette CG, Segrest JP. Use of synthetic peptide analogues to localize lecithin: cholesterol acyltransferase activating domain in apolipoprotein A-I, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 10 (1990) 95–105.
16. Labeur C, Laurence L, Vanloo B, Baert J, Brasseur R, Rosseneu M. Design of a new class of amphipathic helical peptides for the plasma apolipoproteins that promote cellular cholesterol efflux but no activate LCAT, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17 (1997) 580–588.
17. Eisenberg D, Schwarz E, Komaromy M, Wall R. Analysis of membrane and surface sequences with the hydrophobic moment plot, *J. Mol. Biol.* 179 (1984a) 125–142.
18. Eisenberg D, Wesson M, Wilcox W. Hydrophobic moments as tools for analyzing protein sequences and structures. In Prediction of protein structure and principles of protein conformation G. Fasman, ed. (New York: Plenum Press), pp. 635–646.
19. Brasseur R. Differentiation of lipid-associating helices by use three-dimensional molecular hydrophobicity calculations, *J. Biol. Chem.* 24 (1991) 16120–16127.

## **Experimentos *in silico* del C-terminal de CETP y de formación de micelas**

Tomado de:

***J. Struct. Biol.* (2014) 186, 19-27**

***Soft Matter* (2012) 8, 9005-9014**

## Resumen

La proteína CETP promueve la transferencia de éster de colesterol y triglicéridos entre lipoproteínas. El mecanismo mediante el cual realiza este proceso aún no se encuentra establecido. Sin embargo en el laboratorio se han encontrado mediante experimentos con péptidos derivados del segmento C-terminal de CETP que podría ser mediante un proceso de micelización. En este trabajo se evalúa la capacidad de un péptido derivado del segmento C-terminal de CETP ( ${}_{465}\text{EHLLVDFLQSL}_{476}$ ) denominado como hélice-X<sup>12</sup> para agregar lípido en una estructura de tipo micelar. En este experimento *in silico* observamos que la hélice-X<sup>12</sup> presenta la propiedad de estructurar lípido en micelas. En el segundo trabajo que se expone en este mismo capítulo, se propone un método para generar micelas partiendo de una disposición aleatoria de fosfolípidos a diferencia de otros métodos en los cuales se parte de estructuras pre-ensambladas. Posteriormente se aplica un procedimiento denominado “*backmapping*” el cual convierte las estructuras generadas con un campo de fuerza de grano grueso a uno de todos los átomos, posteriormente se realiza de nuevo una simulación para relajar las moléculas. Este método provee una disposición más real de las estructuras micelares generadas a partir de cualquier lípido que se conozca su estructura y se disponga de modelo.

## **Introducción**

Las proteínas son estructuras dinámicas y una gran parte de ellas presentan segmentos específicos que carecen de una estructura secundaria definida. Estos segmentos desordenados pueden estar asociados con el reconocimiento a ligando, receptores, ácidos nucleicos, así como a su interacción con lípidos. Desde hace varios años, nuestro laboratorio estudia la estructura/función de proteínas de membrana, así como de diversas apolipoproteínas [1,2]. Como consecuencia a los cambios de estructura secundaria observados en segmentos peptídicos de las proteínas ApoC-I, ApoA-I y CETP [3-5] hemos propuesto la posibilidad de que estos segmentos dentro de la proteína completa respondan de manera específica a cambios del microambiente que las rodea. A través de transiciones específicas orden-desorden y/o desorden-orden en segmentos de estas proteínas se promueve una función, como la activación de una enzima, la transferencia de lípidos o la interacción con un receptor. Considerando los datos experimentales ampliamente reportados en la literatura, así como los generados en nuestro grupo se propuso que el sitio crítico para la función de CETP está situado en el dominio extremo C-terminal ( $_{465}\text{EHLLVDFLQSLS}_{476}$ ). Este dominio presenta una conformación hélice- $\alpha$  en la estructura cristalina reportada para CETP [4]. En el laboratorio se han realizado estudios estructurales con un péptido derivado de la secuencia de este segmento al que se le ha denominado hélice-X<sup>12</sup>. Se analizó el efecto de ambientes acuosos y miméticos a lípido en la estructura de hélice-X<sup>12</sup>. Utilizando técnicas como DLS y microscopía electrónica de transmisión (TEM del inglés *transmission electron microscopy*) se observó que la hélice-X<sup>12</sup>, tiene la capacidad de inducir la formación de micelas con un diámetro de 2-10 nm. Estos resultados permitieron plantear una hipótesis sobre el mecanismo por el cual CETP

podiera estar llevando a cabo la transferencia de lípidos basados en la formación de pequeñas micelas en su segmento C-terminal. Actualmente existe otro mecanismo propuesto por Quiu *et al.* [6], donde proponen un modelo de túnel con un costo de energía alto y una capacidad de transferencia muy baja de moléculas de lípidos neutros por proteína, por lo que es poco viable este mecanismo. La variedad de técnicas experimentales con las que hasta el momento se ha trabajado nos ha servido para obtener información sumamente valiosa sobre como CETP lleva a cabo la transferencia de lípidos, sin embargo, todavía quedan incógnitas importantes por resolver como es la manera en la cual los lípidos interactúan con CETP a escala atómica. Las dinámicas moleculares son herramientas que nos permitieron hacer este acercamiento y mediante esta técnica se pudo modelar un sistema complejo como lo es un péptido en presencia de varias moléculas de fosfolípido. Por otro lado, en el laboratorio también estamos interesados en modelar sistemas que semejen estructuras como las lipoproteínas y una opción son las estructuras micelares de fosfolípidos. Usualmente en este tipo de estudios se utilizan estructuras pre-ensambladas o son realizadas a un nivel de grano-grueso (GG), ambas aproximaciones presentan limitaciones. Por este motivo, se propuso un método de simulación multiescala (método *backmapping*) donde se representa la fase de formación de la micela a un nivel de grano grueso y posteriormente se considera una resolución más fina o de grano fino (GF) para estudiar su interacción con el disolvente o con otras moléculas como proteínas.

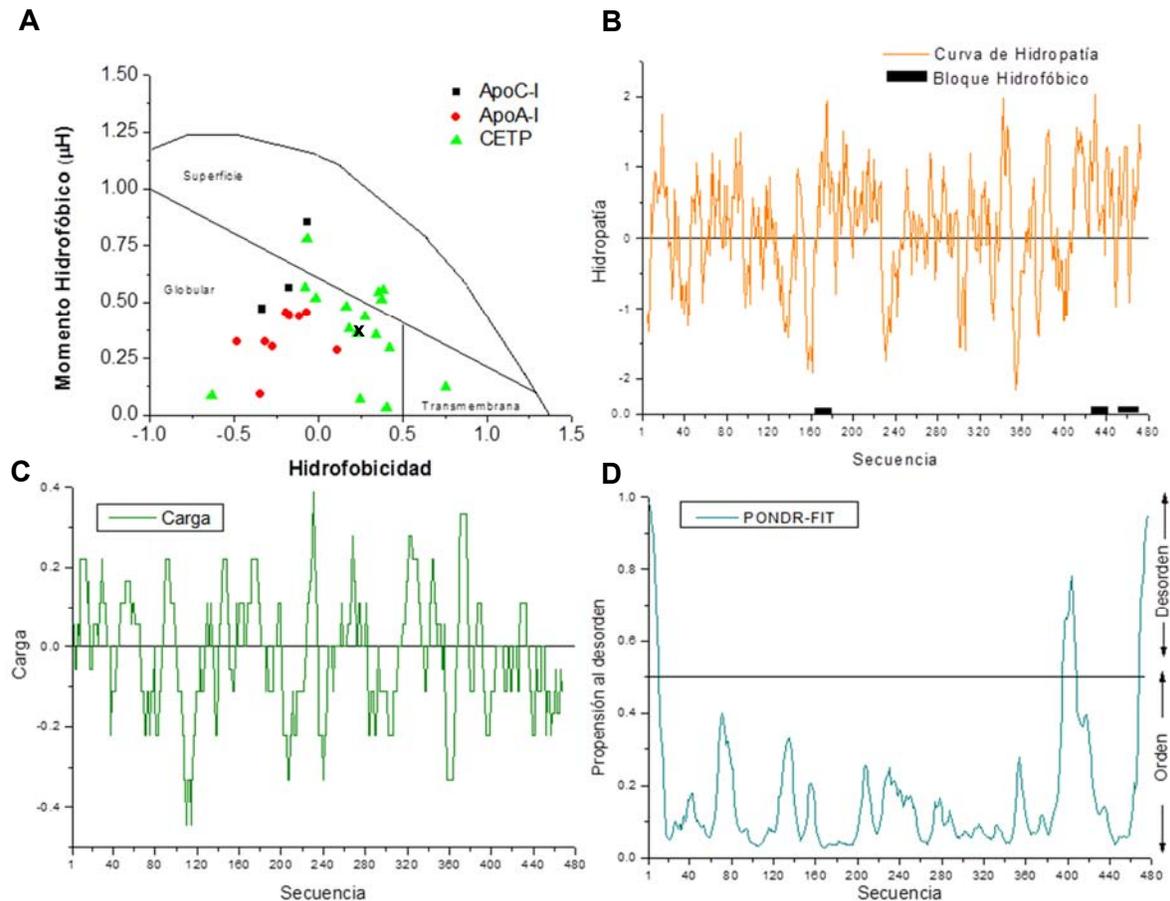
## **Análisis estructural de CETP**

La proteína CETP es una proteína plasmática de 476 residuos, con un peso molecular aproximado de 67 kDa, contiene glicosilaciones y casi la mitad de sus residuos son de tipo hidrofóbico. Esta proteína promueve la transferencia de ésteres de colesterol y triglicéridos principalmente entre HDL hacia lipoproteínas LDL y VLDL. Por otro lado CETP, puede transferir triglicéridos de VLDL hacia HDL generando un cambio en la composición y tamaño de esta última. En varios estudios se ha propuesto que el dominio localizado en el extremo C-terminal (465E-476S), estructurado como una hélice- $\alpha$  anfipática podría ser un dominio clave para la transferencia de lípidos. Varios estudios realizados en nuestro laboratorio indican que el mecanismo por el cual se lleva a cabo la transferencia de lípidos está basado en la formación de un sistema micelar en el dominio C-terminal específicamente en los residuos E<sub>465</sub>-S<sub>476</sub>. Este mecanismo explicaría la transferencia de ésteres de colesterol entre lipoproteínas en un ambiente acuoso como lo es el plasma, en el cual es básico la conservación de una estructura hélice- $\alpha$  en la región que corresponde al C-terminal para que se realice este proceso.

La estructura de CETP presenta varias hélices- $\alpha$  las cuales interaccionan con la monocapa de fosfolípidos que conforman a las lipoproteínas, en este contexto varias de estas hélices corresponden al tipo hélice- $\alpha$  globular o G\*, lo que indica su alto grado de hidrofobicidad (Fig. 1A). En el análisis de los gráficos observamos que el segmento C-terminal no corresponde a una hélice- $\alpha$  de tipo transmembranal, el cual podría ser un mecanismo para generar la micela. Sin embargo, entra en la zona de hélices- $\alpha$  con orientación oblicua lo cual favorece que penetre en la membrana y la

desestabilice como el caso de varias proteínas fusogénicas (Tabla 1, Cap. 3). Así mismo, este segmento presenta una hidrofobicidad promedio similar a otras partes de la proteína, pero su posición de segmento terminal le otorga la facilidad de interactuar libremente con superficies lipídicas a manera de sensor (Fig. 1B). Mediante un análisis de hidrofobicidad de la molécula de CETP con el servidor HCA [7] observamos que a lo largo de la secuencia presenta varios bloques hidrofóbicos calculados a partir de la estructura secundaria hélice- $\alpha$ , siendo los segmentos que corresponden a los aminoácidos 165Q-180K, 420E-433M, 451R-473Q los más importantes (Fig. 1B). El extremo C-terminal de CETP en promedio es un segmento con carga negativa, lo cual podría influir en las interacciones electrostáticas al entrar en contacto con la superficie de las lipoproteínas (Fig. 1C). Se ha observado que las lipoproteínas presentan un potencial de superficie electrostático con valores de entre -10.5 a -12.5 mV para la HDL y -3.5 a -5.0 mV para la LDL [8]. Sin embargo, el dominio C-terminal presenta características estructurales semejantes al dominio de unión de virus, el cual desestabiliza las membranas celulares. Además mediante un análisis *in silico* con el servidor PONDR-FIT (del inglés *Predictor of Natural Disordered Regions*) se observó que es un segmento con tendencia al desorden (Fig. 1D). Estas características estructurales aunadas a que es un dominio altamente conservado (Fig. 2) dan indicio de que el extremo C-terminal es imprescindible para la función que realiza CETP y su interacción con membranas. En este caso los valores promedio no reflejan el sutil equilibrio que guarda la secuencia y la estructura secundaria, ya que este segmento presenta la propiedad de tener un puente salino que congela la hélice- $\alpha$  entre los aminoácidos H466 y D470. Una consecuencia de ello es la estabilización

de la hélice- $\alpha$  anfipática con los aminoácidos hidrofóbicos perfectamente polarizados y de esta manera se optimiza la interacción con la membrana.



**Fig. 1.** Análisis *in silico* de la secuencia de CETP. A) Clasificación de estructuras helicoidales que componen a las proteínas ApoC-I, ApoA-I y CETP con base en su estructura cristalina. El segmento marcado con una X corresponde a la hélice de extremo C-terminal de CETP que incluye los aminoácidos 464E-474S. B) Perfil de hidrofobicidad calculado con el servidor EMBOSS:Pepinfo [9], usando una ventana de 9 aa y la escala hidrofóbica de Kyte & Doolittle [9], línea naranja. Los bloques hidrofóbicos calculados con el servidor HCA [7], recuadro negro. C) Perfil de carga

calculada con el servidor EMBOSS Pepinfo usando una ventana de 9 aa [10].

D) Propensión al desorden determinado con el algoritmo PONDR-FIT [11].

Hombre	D	G	F	L	L	L	Q	M	D	F	G	F	P	E	H	L	L	V	D	F	L	Q	S	L	S
Orangutan	D	G	F	L	L	L	Q	M	D	F	G	F	P	E	H	L	L	V	D	F	L	Q	S	L	S
Macaco	D	G	F	L	L	L	Q	M	D	F	G	F	P	E	H	L	L	V	D	F	L	Q	S	L	S
Ardilla	D	G	F	L	L	L	Q	M	D	F	G	F	P	E	H	L	L	V	D	F	L	Q	S	L	G
Dasiuro	E	G	Y	L	V	L	Q	M	D	F	G	F	P	Q	H	L	L	E	D	F	L	Q	T	I	I
Quail	K	G	Y	L	V	L	Q	M	D	F	G	F	P	Q	H	L	L	E	D	F	L	Q	T	I	I
Pinzón	K	G	Y	V	I	V	Q	L	D	F	G	F	P	N	H	L	L	L	N	F	L	E	K	S	L
Pato	K	G	Y	L	I	V	Q	L	D	F	S	F	P	N	H	L	L	L	D	F	L	Q	K	G	F
Gallo	K	R	Y	L	I	V	Q	L	D	F	S	F	P	N	H	L	L	L	D	F	L	E	K	T	L

**Fig. 2.** Alineamiento de segmento C-terminal de CETP (452D-476S) con secuencias ortólogas. La intensidad del color refleja el porcentaje de conservación del aminoácido.

## I. Metodología de las simulaciones del péptido CETP en presencia de fosfolípido.

### Parámetros generales

Las simulaciones en GG fueron realizadas con condiciones periódicas a la frontera utilizando el programa de dinámica molecular GROMACS v3.3.3 [12] y realizadas en un ensamble NPT. El agua y las moléculas de surfactante fueron acopladas de manera separada a un termostato de Berendsen a 300 K con un periodo común de 1 ps. La presión fue isotrópicamente controlada a 1 bar usando un baróstato de Berendsen [13], con una compresibilidad isotérmica de  $5 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$ . Las coordenadas iniciales para la hélice-X<sup>12</sup> fueron obtenidas de los experimentos de

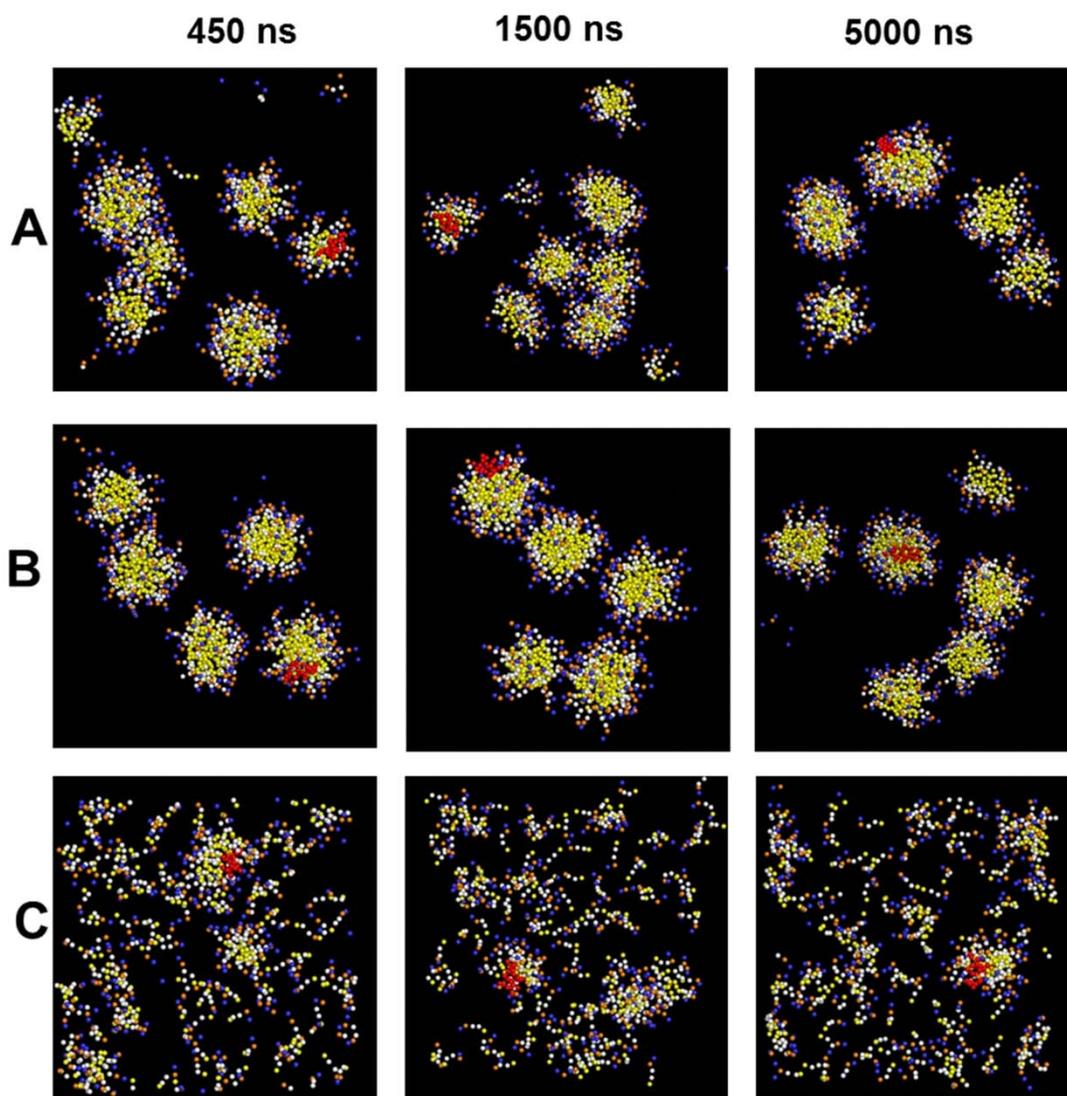
difracción de rayos X (PDB: 2obd) [6]. El campo de fuerza MARTINI v2.0 fue empleado para un modelo de moléculas de grano grueso [7].

### **Simulación en grano grueso**

Los lípidos fueron parametrizados usando cuatro esferas para la cabeza de PC y los primeros 2-3 CH<sub>2</sub> grupos del surfactante, para el resto de la molécula se utilizaron de una a tres esferas hidrofóbicas adicionales. El modelo para el agua es una esfera que contiene cuatro moléculas de agua, la ventaja de utilizar este campo es un menor tiempo de simulación debido a que la representación de cada molécula es sencilla, se trabaja con grupos de átomos. Se eligió una caja rómbica dodecaédrica con una longitud de 15 nm en sus vectores principales en la que se colocó una mezcla aleatoria consistente de 234 moléculas en GG de lípido, 23415 aguas Martini (equivalentes a 93660 moléculas de agua atomísticas), 1 estructura hélice-X<sup>12</sup> y 2 átomos de iones Na<sup>+</sup>. En cada sistema la energía fue minimizada usando el método de paso descendiente y se corrieron tres trayectorias independientes con 5  $\mu$ s de longitud para cada sistema utilizando diferentes velocidades iniciales. Las interacciones de no-enlace fueron evaluadas mediante un rango de corte de 1.2 nm. El potencial L-J fue desplazado suavemente a cero entre 0.9 y 1.2 nm. Una aproximación similar fue empleada para interacciones electrostáticas, considerando un potencial Coulómbico con una permitividad relativa de 15 junto con un cambio en la función de 0 a 1.2 nm. La lista de vecinos se actualizó cada 10 pasos y el análisis de la trayectoria se realizó usando herramientas del paquete GROMACS [12], RasMol v2.7 [14] y Pymol v0.99 [15].

## Resultados

Las simulaciones obtenidas con el péptido hélice-X<sup>12</sup> en presencia del fosfolípido 1-palmitoil-2-hidroxi-*sn*-glicero-3-fosfocolina (PPC) y 1-lauroil-2-hidroxi-*sn*-glicero-3-fosfocolina (LPC) permitieron generar estructuras micelares con diámetros aproximados a los observados mediante la técnica de TEM. El desarrollo de estas simulaciones en presencia del fosfolípido 1-hexanoil-2-hidroxi-*sn*-glicero-3-fosfocolina (HPC) y el péptido hélice-X<sup>12</sup> mostró que éste posee características hidrofóbicas importantes debido a que generó agregados micelares que en su ausencia no se hubieran formado. Estas estructuras presentan un promedio de 65 a 70 moléculas de lípido por péptido y sus diámetros son de 5 nm (Fig. 3).



**Fig. 3.** Simulaciones de dinámica molecular de lípidos en presencia del péptido hélice-X<sup>12</sup>. Las simulaciones de dinámica molecular se generaron a 450, 1500 y 5000 ns. En (A) se muestra al péptido hélice-X<sup>12</sup> con LPC, en (B) con PPC y (C) con HPC. La estructura del péptido se muestra en rojo y no se muestran las moléculas de agua para mayor claridad.

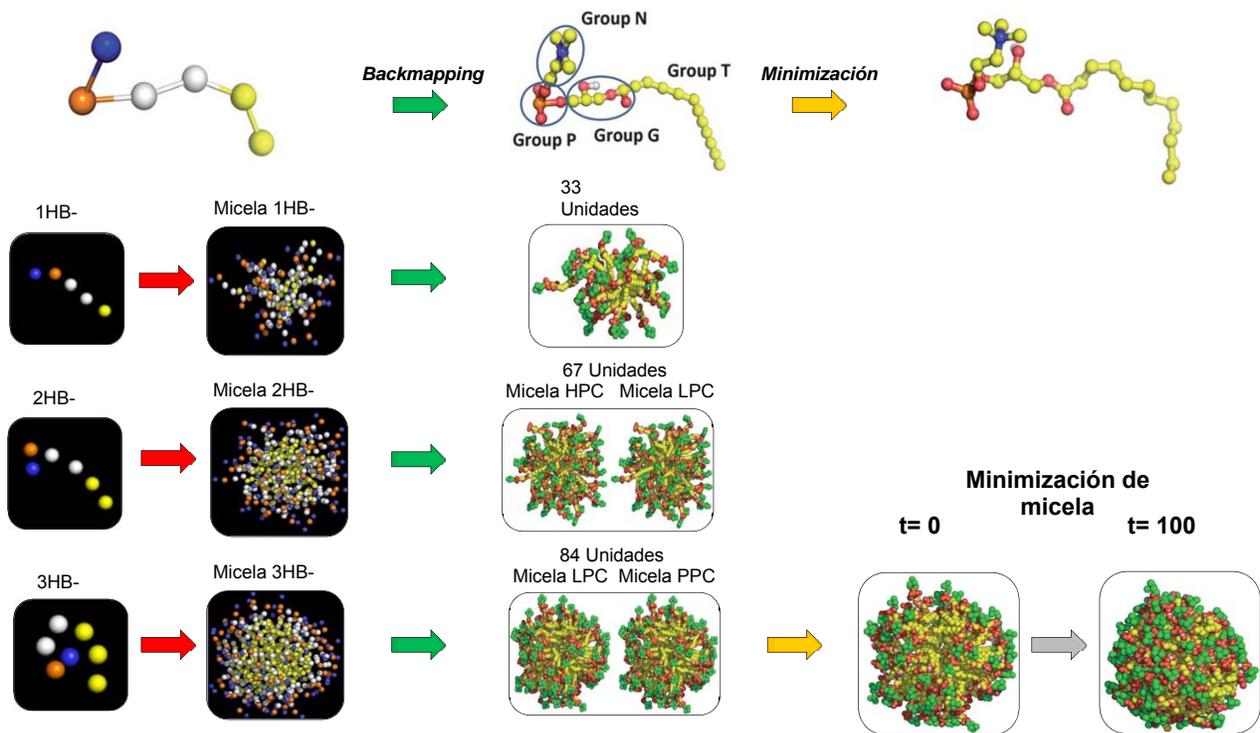
## II. Metodología para las simulaciones de micelas de fosfolípido

### Método de *backmapping*

Este método consiste en generar de forma espontánea micelas de lípido utilizando un campo de fuerza de grano grueso. Posteriormente se seleccionan las micelas representativas de cada trayectoria. Las coordenadas atómicas de cada molécula que componen las micelas se obtienen por una simple interpolación/extrapolación geométrica de las coordenadas de GG aproximando las distancias y los ángulos entre los átomos unidos. De esta manera se toma el primer átomo de la cadena y se distribuyen las coordenadas remanentes  $n-1$  a lo largo del segmento de manera equidistante. Posteriormente se realizó una minimización de 100 ns (Fig. 4).

### Parámetros generales de las simulaciones

Se utilizó GROMACS, v.3.3.3 [12] y las herramientas incluidas para el análisis de las trayectorias. Las ecuaciones de movimiento fueron integradas con el método de salto con pasos de tiempo de 30 y 2 fs para las simulaciones GG y GF respectivamente. Todas las simulaciones fueron realizadas en un ensamble NPT. Las condiciones de temperatura y presión fueron reguladas mediante un barostato y termostato de Berendsen [13].



**Fig. 4.** Método de *backmapping*. En la parte superior se muestra una molécula de fosfolípido en grano grueso que aplicando el método de *backmapping* genera la molécula a nivel atómico de LPC. Posteriormente se realizó una minimización de 100 ns. Este mismo procedimiento se replica para las moléculas 1HB-PC y 3HB-PC, donde HB significa *hydrophobic ball*

### Simulaciones de grano grueso

Se generaron tres tipos de moléculas hidrofóbicas 1HB-PC, 2HB-PC y 3HB-PC para generar las micelas (Fig. 4). El campo de fuerza utilizado fue MARTINI (versión 2.0) [7]. Se realizaron mezclas aleatorias de 234 moléculas GG y ~23000 partículas de agua MARTINI dentro de una caja dodecaédrica de 15 nm. La concentración final del surfactante fue de ~139 mM. Una vez generada la micela y debido a que no existe una regla definida para la equivalencia entre estructuras en GG y GF se realizó la siguiente transformación para generar las micelas a nivel atómico. La molécula de 1HB-PC en GF representa la estructura de HPC, la molécula 2HB-PC representa la estructura del HPC y además del LPC, por último la molécula 3HB-PC representa la estructura del LPC y del PPC. Se generaron tres micelas para cada uno de los diferentes tipos de fosfolípido. Cada sistema de energía se minimizó mediante el método de paso descendente y posteriormente se generaron 6 trayectorias de 5  $\mu$ s comenzando por diferentes velocidades iniciales. Se empleó un límite de 1.2 nm para interacciones de no enlace. El potencial L-J se desplazó suavemente a cero entre 0.9 nm y 1.2 nm. Una aproximación similar se empleó para las interacciones electrostáticas, considerando un potencial Coulómbico con una permitividad relativa de 15. Se analizó el número de agregados formados en función del tiempo, así como el número de fosfolípidos que los componen (Fig. 5).

### Simulaciones de grano fino

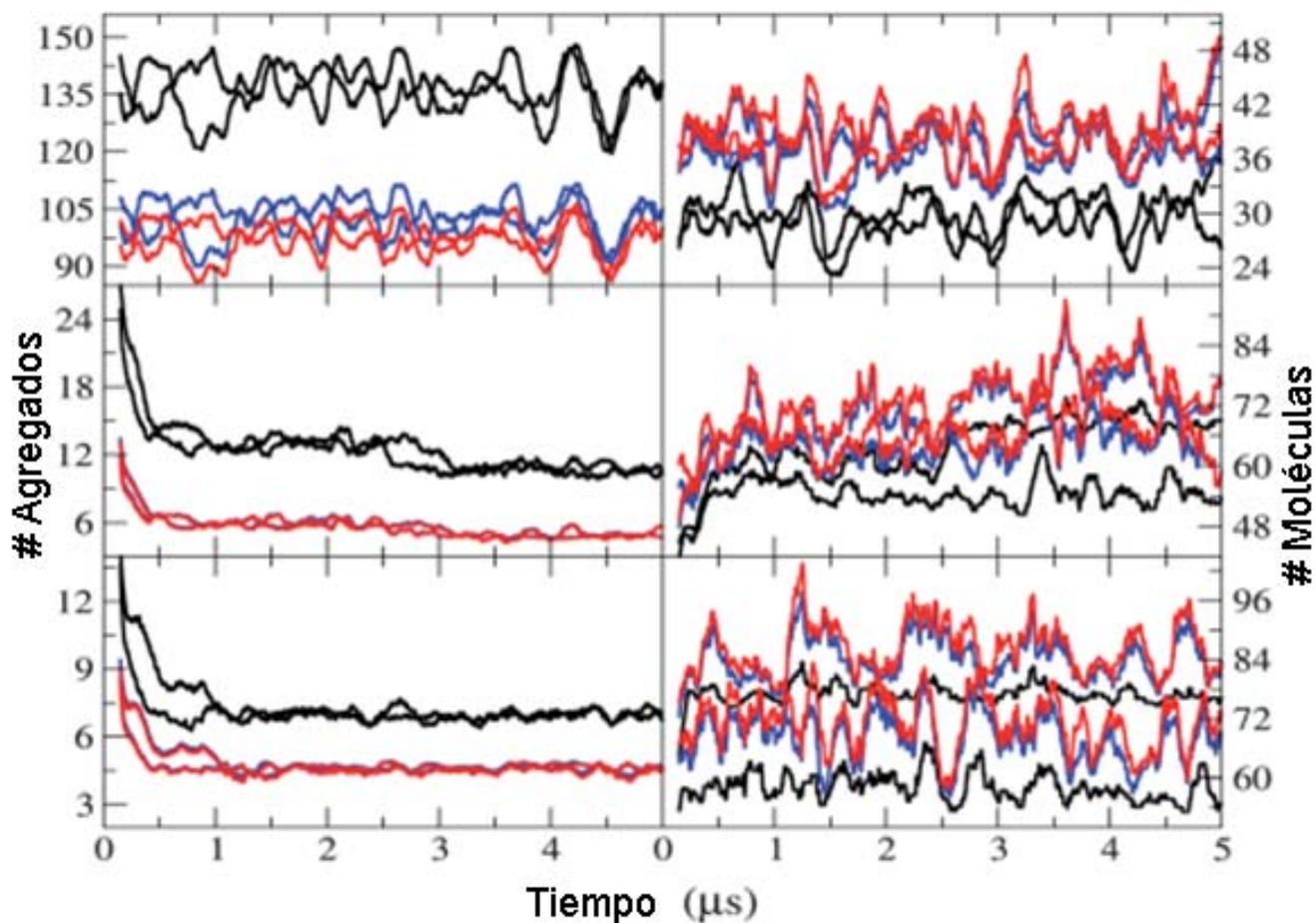
Se utilizó el modelo de agua SPC/E (del inglés *simple point charge extendent*) [16] y el campo de fuerza GROMOS96 (53a6) [17] para las moléculas surfactantes. Se generó una caja rómbica y se llenó con un número de moléculas de agua entre 10 452

y 13 063, dependiendo del sistema. Se generaron 6 trayectorias con cada micela usando un corte de 0.5, 0.6 y 0.7 nm. Así mismo se analizó el área superficial accesible a solvente y la movilidad de los fosfolípidos en las micelas (Figs. 6 y 7).

## **Resultados**

Las simulaciones de dinámica molecular a nivel de GG son útiles para los procesos de autoensamblaje, mientras que la resolución de GF compete a estudios más finos como son la interacción de estructuras proteicas con moléculas circundantes, incluyendo el disolvente. Los estudios multiescala que toman ventaja de ambos niveles de resolución requieren un método de mapeo de GG a GF. En este trabajo se presenta un método relativamente más simple en comparación a los que se han reportado a la fecha [18-22]. Este método de “*backmapping*” está basado en la interpolación/extrapolación de posiciones atómicas, tomando en cuenta la estructura de GG como referencia. En las simulaciones de GG se monitoreó la agregación espontánea de las moléculas de fosfolípido en función del tiempo utilizando valores de corte de 0.4, 0.5, 0.6 y 0.7 nm para definir la interacción entre ellos. En el valor de 0.4 se observó que es muy corta la distancia para este análisis debido que esta resolución está muy próxima a la distancia entre dos moléculas (0.47 nm). Así mismo, los valores de 0.6 y 0.7 nm presentan un comportamiento similar. En la Fig. 5 se muestran 2 trayectorias representativas de los tres sistemas nHB-PC para cada valor de corte. En general se observó la tendencia esperada, que es una disminución en el número de grupos a lo largo de las trayectorias mientras que aumentan su tamaño (Fig 5, panel izquierdo). De los agregados generados se seleccionó el más grande para

estudiar las fluctuaciones de los monómeros que los componen y los resultados se muestran en la Fig. 5, panel derecha.

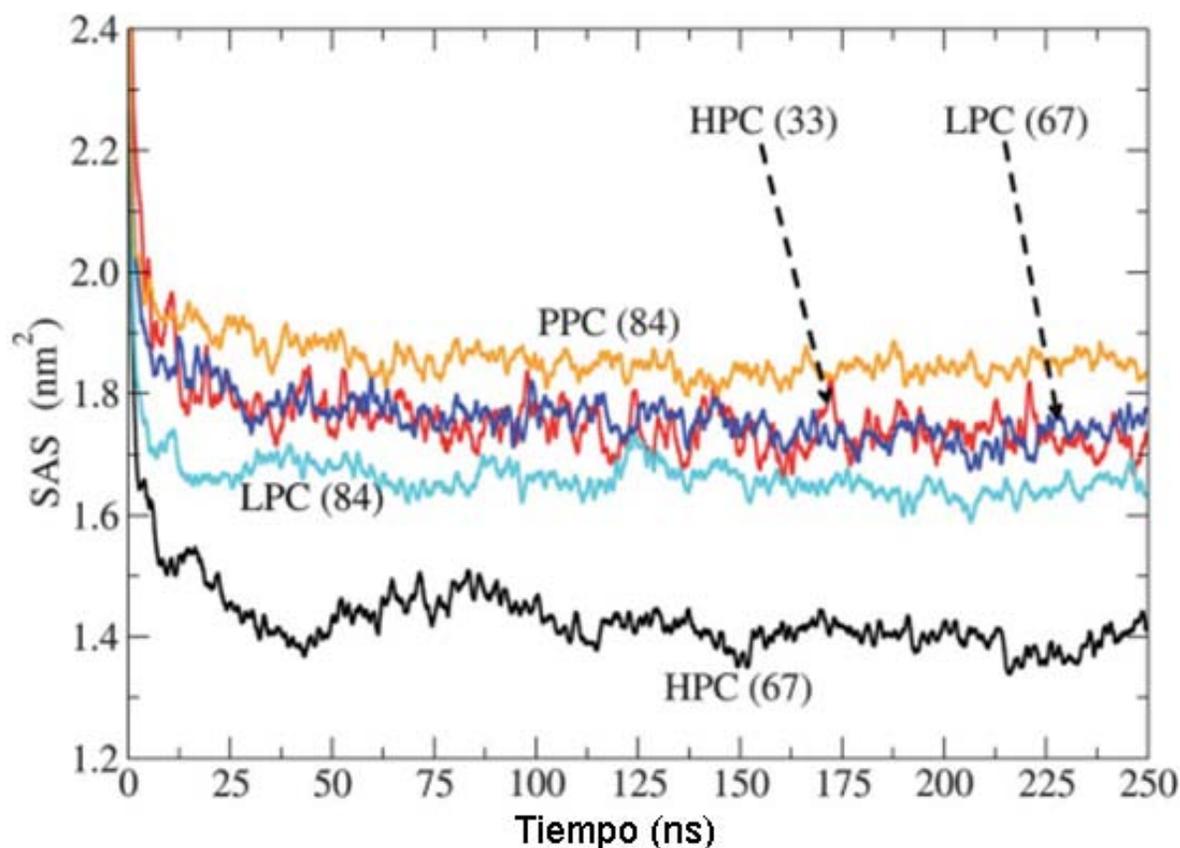


**Fig. 5.** Número de agregados (izquierda) y número de moléculas/agregados (derecha) como una función del tiempo, para dos de las seis trayectorias corridas para 1HB-PC (arriba), 2HB-PC (medio) y 3HB-PC (bajo). Los análisis se realizaron usando diferentes cortes para definir la interacción entre moléculas de GG. Cada color representa un corte: 0.5 ●, 0.6 ●, 0.7nm ●.

De estas simulaciones en GG fueron seleccionadas tres micelas de cada sistema nHB-PC con 33, 67 y 84 monómeros, las cuales fueron utilizadas para hacer “*backmapping*” y las subsecuentes simulaciones en GF (Fig.4). Los agregados seleccionados fueron aquellos más grandes y más estables a lo largo de las trayectorias y después de aplicar el método de “*backmapping*” se generaron 5 micelas en total en GF, dos micelas de HPC con 33 y 67 moléculas, dos micelas de LPC con 67 y 84 moléculas y una micela de PPC con 87 moléculas. Se corrieron para cada sistema en GF trayectorias de 250 ns y se evaluó el área accesible a solvente, tamaño y geometría.

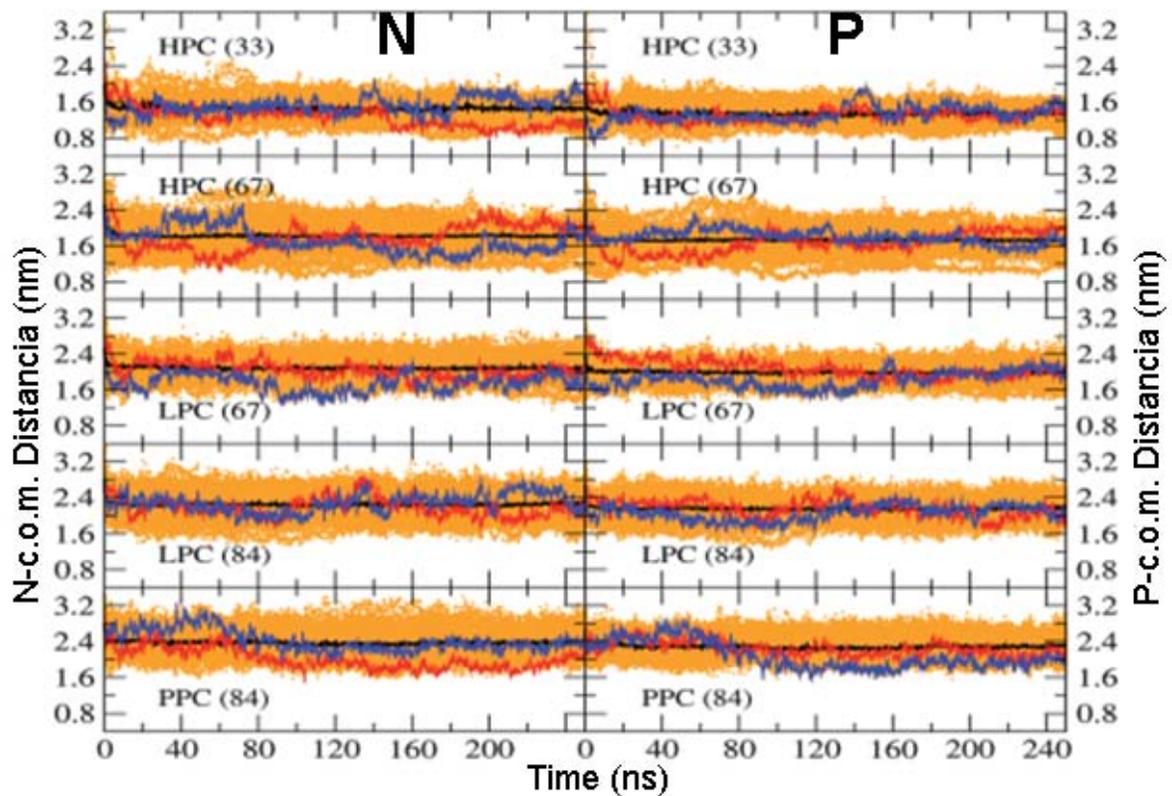
Con respecto al área accesible a solvente (SAS del inglés *solvent accessible surface*) se observó que este valor es sensible al número de moléculas de surfactante en la micela (Fig.6). Durante los primeros segundos de la simulación los valores son irreales pero después de 10 a 25 ns alcanza un valor estable. El SAS para la micela de 33-HPC es casi la misma que para la de 67-LPC, le sigue en orden decreciente las micelas 84-LPC y 67-HPC. De estos datos se derivó la relación empírica  $n/n_s$ , en donde n corresponde al número de átomos de carbono en la cadena acílica y  $n_s$  es el número de moléculas en la micela. Para determinar el tamaño y la deformación dinámica de cada micela como una función del tiempo se realizaron medidas en cada átomo de nitrógeno (N) y fósforo (P) al centro de masa (c.o.m) del agregado correspondiente (Fig.7).

El promedio de estos valores en cada imagen o *frame* podría ser interpretado como una medida del radio geométrico de la micela. En estos resultados se observó que la molécula más larga origina los valores de diámetro mayores, sin embargo, los agregados obtenidos no son rígidos (Fig. 7). Las moléculas de surfactante difunden lateralmente sobre la superficie y hacia arriba-abajo en dirección radial. Observando la estructura del fosfolípido en la figura 4, encontramos que el grupo P se encuentra más obstaculizado en su movimiento que el grupo N. Por otro lado la distancia N-c.o.m representa de manera hipotética el radio de la esfera por lo que esta medición podría correlacionarse al radio hidrodinámico, el cual incluye efectos de forma y disolvente



**Fig. 6.** Gráfico de SAS por molécula como función del tiempo. En el gráfico se muestra el promedio para cada micela en una configuración de grano fino.

En este trabajo se reporta por primera vez la difusión lateral de surfactantes en micelas, observando que las moléculas individuales difunden en la micela como los lípidos lo hacen en una membrana fluida.



**Fig. 7.** Distancia de cada átomo de N y P al centro de masa de la micela como función del tiempo. Centro de masa de la micela (c.m.m) ●, los colores ● y ● corresponden a dos átomos de N o P seleccionados al azar para medir su distancia al c.m.c.

## Conclusiones

Las transiciones de estructura secundaria del dominio C-terminal de CETP son claves en la función que realiza esta proteína y con el conocimiento previo de que la estructura helicoidal es la forma funcional, este acercamiento *in silico* permitió corroborar que en un ambiente lipídico es capaz de estructurar los lípidos en micelas. Estos datos corroboran lo observado mediante TEM con lo cual se da un paso más respecto a la elucidación del mecanismo por el cual CETP realiza el transporte de lípidos entre lipoproteínas. En una intención por generar modelos *in silico* y de esta forma estudiar los procesos realizados por CETP y apolipoproteínas, en el grupo de investigación se implementó una metodología para generar micelas de fosfolípido. Se observó que a nivel atómico las micelas presentan una geometría prácticamente esférica y el radio N-c.o.m podría ser un valor aceptable como radio geométrico en este caso. En general, esta metodología proporciona estructuras micelares que reproducen trabajos experimentales. Mediante la implementación de este método contribuimos en manera importante al estudio sobre los procesos que rigen la formación de nanoagregados. En los capítulos anteriores y en este mismo se revisaron los mecanismos por los cuales proteínas como la ApoA-I, ApoC-I y CETP podrían estar llevando a cabo su función, sin embargo en el laboratorio también tenemos el interés de explorar las transiciones desorden-orden que generan proteínas mal plegadas y por tanto enfermedad. En este contexto, revisamos los posibles mecanismos hasta ahora descritos de varias proteínas involucradas en enfermedades generadas por un plegamiento anómalo, el cual será expuesto en el siguiente capítulo.

## Perspectivas

El estudio de CETP mediante dinámicas moleculares hasta el momento se ha venido realizando mediante simulaciones en GG por el tamaño de la proteína, sin embargo, el poder diseccionar un segmento con una función relevante como fue el segmento C-terminal abre varias posibilidades para su posterior estudio con éste método. Se plantea como siguiente paso abordar dinámicas de este péptido pero en presencia de membranas de fosfolípidos y micelas con un núcleo de moléculas como éster de colesterol y triglicéridos. Así mismo, explorar con el método de “backmapping” el ensamblado de estructuras complejas como son las lipoproteínas, que hasta el momento se ha venido estudiando mediante modelos preensamblados en grano grueso.

## Referencias

1. Xicohtencatl-Cortes J, Castillo R, Mas-Oliva J. In search of new structural states of exchangeable apolipoproteins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324 (2004) 467-470.
2. Ramos S, Campos-Terán J, Mas-Oliva J, Nylander T, Castillo R. Forces between hydrophilic surfaces adsorbed with apolipoprotein All alpha helices, *Langmuir* 24 (2008) 8568-8575.
3. Mendoza-Espinosa P, Moreno A, Castillo R, Mas-Oliva J. Lipid dependant disorder-to order conformational transitions in apolipoprotein CI derived peptides, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 365 (2008) 8-15.
4. Garcia-Gonzalez V, Mas-Oliva J. Amyloidogenic Properties of a D/N Mutated 12 Amino acid Fragment of the C-terminal domain of the cholesteryl-ester transfer protein (CETP), *Int. J. Mol. Sci.* 12 (2011) 2019-2035.
5. Bolaños-García VM, Soriano-García M, Mas-Oliva J. Stability of the C-terminal peptide of CETP mediated through an (i, i + 4) array, *Biochim. Biophys. Acta* 84 (1998) 7-15.
6. Qiu X, Mistry A, Ammirati MJ, Chrnyk BA, Clark RW, et al. Crystal structure of cholesteryl ester transfer protein reveals a long tunnel and four bound lipid molecules, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14 (2007) 107-113.
7. HCA: <http://mobylye.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/portal.py?form=HCA#forms::HCA>
8. Desrumaux C, Athias A, Masson D, Gambert P, Lallemand C, Lagrost L. Influence of the electrostatic charge of lipoprotein particles on the activity of the human plasma phospholipid transfer protein, *J. Lipid Res.* 39 (1998) 131-142.
9. Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein, *J. Mol. Biol.* 157 (1987) 105-132.
10. EMBOSS Pepinfo [http://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss\\_pepinfo/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_pepinfo/)
11. PONDR-FIT: <http://www.disprot.org/pondr-fit.php>
12. Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE, Berendsen HJ. GROMACS: fast, flexible, and free, *J. Comput. Chem.* 26 (2005) 1701-1718.
13. Berendsen HJC, Postma JPM, van Gunsteren WF, Haak JR. Molecular dynamics with coupling to an external bath, *J. Chem. Phys.* 81 (1984) 3684-3690.

14. RasMol: [www.rasmol.org](http://www.rasmol.org)
15. PyMol: [www.pymol.org](http://www.pymol.org)
16. Berendsen HJC, Grigera JR, Stroatsma TP. The missing term in effective pair potentials, *J. Phys. Chem.* 91 (1987) 6269-6271.
17. Oostenbrink C, Villa A, Mark AE, Van Gunsteren WF. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6, *J. Comput. Chem.* 25 (2004) 1656-1676.
18. Marrink S, Risselada H, Yefimov S, Tieleman D, de Vries A. The MARTINI Force Field: coarse grained model for biomolecular simulations, *J. Phys. Chem. B*, 111 (2007) 7812–7824.
19. Tschöp W, Kremer K, Hahn O, Batoulis J, Bürger T. Simulation of polymer melts II. From coarse-grained models back to atomistic description, *Acta. Polym.* 49 (1998) 75–79.
20. Heath A, Kavrakli L, Clementi C. From coarse grain to all atom: toward multiscale analysis of protein landscapes, *Proteins* 68 (2007) 646–661.
21. Rzepiela A, Schäfer L, Goga N, Risselada H, De Vries A, Marrink SJ. Reconstruction of atomistic details from coarse-grained structures, *Comput. Chem.* 31 (2010) 1333–1343.
22. Stansfeld PJ, Sansom M. Multiscale simulations reveal conserved patterns of lipid interactions with aquaporins, *J. Chem. Theory Comput.* 7 (2011) 1157–1166.

**Enfermedad asociada a la  
conformación de proteínas**

Tomado de:

*Mol. Cell. Res. Biochem.* (2009) 330, 105-120

## Resumen

Actualmente existen evidencias que sugieren que las proteínas pueden desempeñar funciones importantes por medio de segmentos no estructurados. Esto contrasta con la visión clásica de que la función de una proteína depende de una estructura tridimensional definida. Los estados intermedios entre una proteína plegada y totalmente desnaturalizada se conocen como glóbulo fundido. Estos intermediarios proteicos pueden adoptar una gran variedad de conformaciones por medio de interacciones altamente específicas pero de baja afinidad. Dichos cambios de conformación en las proteínas, conocidos como transiciones desorden-orden, podrían explicar un importante número de procesos biológicos y patológicos en las células.

## Introducción

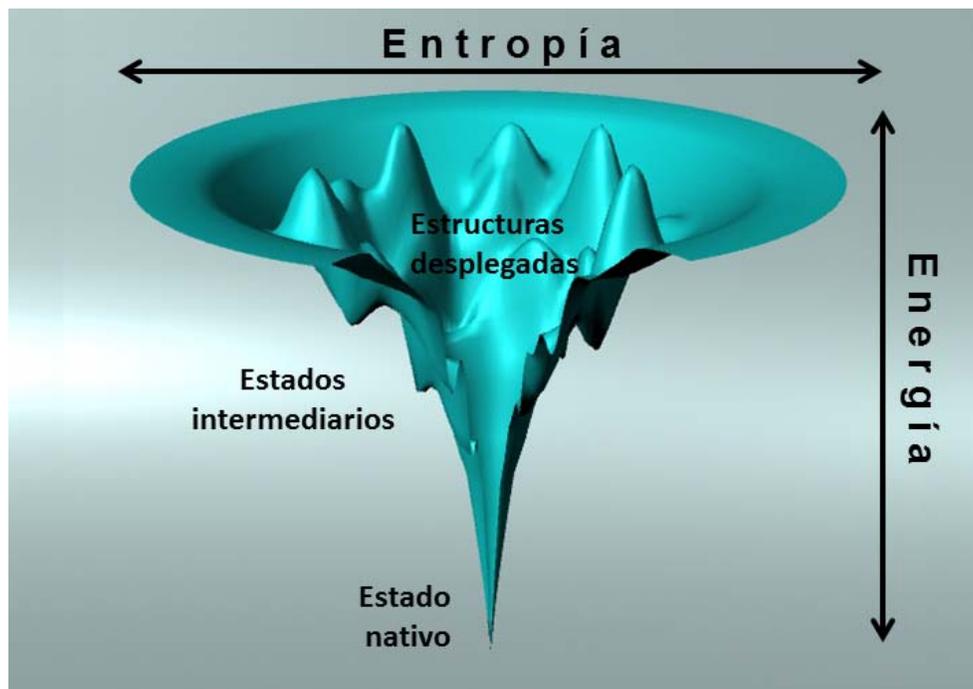
Desde hace muchos años el concepto de enfermedad se ha asociado directamente con anomalías específicas en las interacciones proteína-proteína, proteína-ADN y proteína-ARN. Este conocimiento acumulado ha dado cabida al desarrollo de un área llamada proteómica la cual ha permitido la creación de terapias novedosas [1]. Con base a este nuevo tipo de estudios, un número importante de enfermedades se han asociado específicamente con el plegado anómalo en las proteínas. El concepto de plegamiento de proteínas está directamente relacionado con transiciones desorden-orden, mediante las cuales una cadena polipeptídica desplegada adquiere una estructura específica y funcional [2]. Durante mucho tiempo se pensó que éste era un concepto teórico y fue hasta hace poco que se hizo evidente que las proteínas plegadas de manera incorrecta podrían estar relacionadas con enfermedades. Posteriormente, estas anomalías se clasificaron en dos grupos donde el primero

incluye errores de tipo genético (ej. mutaciones en la proteína p53) y el segundo se refiere a la presencia de grandes cantidades de proteína mal plegada generando alteraciones conocidas como amiloidosis. Este tipo de alteraciones se encuentran en la enfermedad de Alzheimer, Creutzfeldt-Jakob, Parkinson y diabetes mellitus tipo II no-insulinodependiente. Todas las enfermedades mencionadas anteriormente se sabe que se originan por la presencia de agregados de proteínas constituidas de fibrillas amiloides, sin embargo, existen otros factores como los mecanismos de formación y propagación, los cuales todavía no se entienden en su totalidad.

### **Enfoque fisicoquímico**

En general las proteínas para plegarse a su estado nativo requieren la intervención de todas las interacciones débiles como son puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas. Una cadena de polipéptido comienza a plegarse cuando se le coloca en un medio acuoso debido a interacciones hidrofóbicas y rápidamente adquiere una conformación de un glóbulo fundido seguido por una liberación importante de calor latente. La estabilización del glóbulo fundido es alcanzado principalmente cuando los residuos hidrófobos ya no interaccionan con la matriz de agua. Por otra parte, debido a que los residuos polares contenidos en una proteína desarrollan interacciones intra e intermoleculares, estas últimas entre proteína-proteína y proteína-agua, se observa la formación de estructuras hélices- $\alpha$  y hojas- $\beta$ . Se ha calculado que este tipo de enlaces podrían ser del orden de  $10^{-12}$  s, muy similares a los que encontramos en el agua. Las proteínas que en equilibrio presentan estructuras desplegadas pueden adquirir una conformación de glóbulo fundido o una estructura 3D definida por medio de dos etapas o estados. La primera etapa corresponde a un estado que ocurre

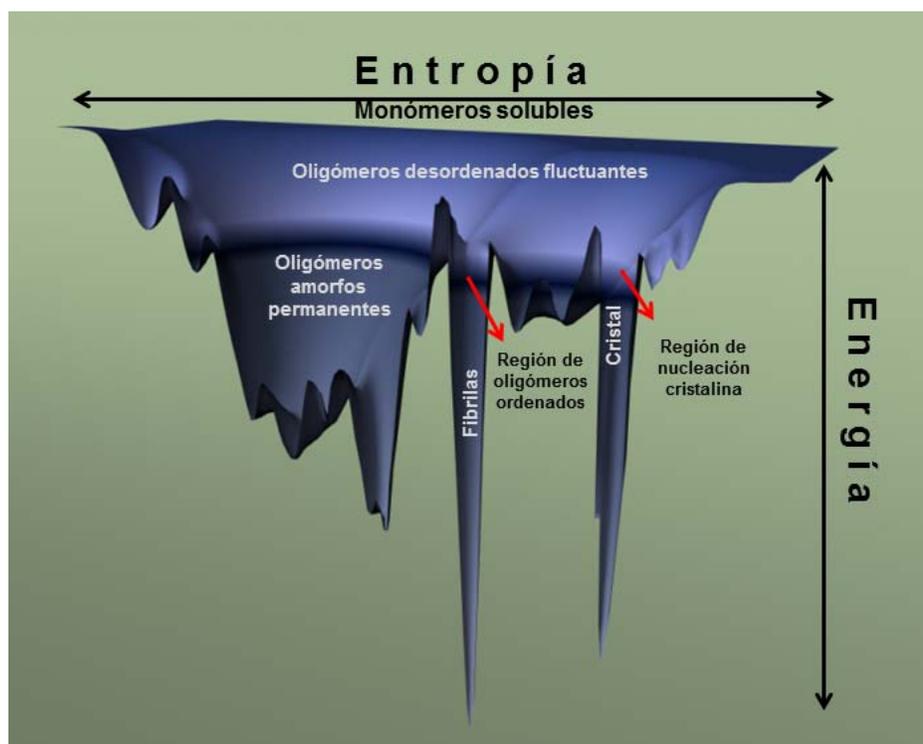
rápido, durante el cual la proteína desplegada llega a la conformación de glóbulo fundido; el segundo estado transcurre lento y es donde este último se transforma en la estructura nativa de la proteína [3]. Estas dos etapas de plegamiento de la proteína pueden ser ilustrados por un “embudo de plegamiento” en el cual debido a un pequeño cambio en la entropía con una gran pérdida de energía, el glóbulo fundido evoluciona hacia el estado nativo (Fig. 1) [4].



**Fig. 1.** Embudo de plegamiento. Las proteínas globulares se organizan a partir de una conformación desordenada pasando por un estado intermedio como lo es el glóbulo fundido hasta alcanzar su estructura nativa.

Aunque el proceso es extremadamente eficiente, siempre existe la posibilidad de que este mecanismo pueda fallar y se pueda encontrar una proteína plegada en una conformación no nativa. Las proteínas que siguen esta vía podrían presentar conformaciones con una estabilidad transitoria, que a su vez interactuarían con otras moléculas facilitando la formación de oligómeros amorfos y en consecuencia un

estado de agregación. La agregación no se genera a partir de un estado desplegado, sino más bien a partir de una serie de intermediarios que considerando el tipo de estructura secundaria adquirida durante el plegamiento puede o no parecerse al estado nativo (Fig. 2) [5].



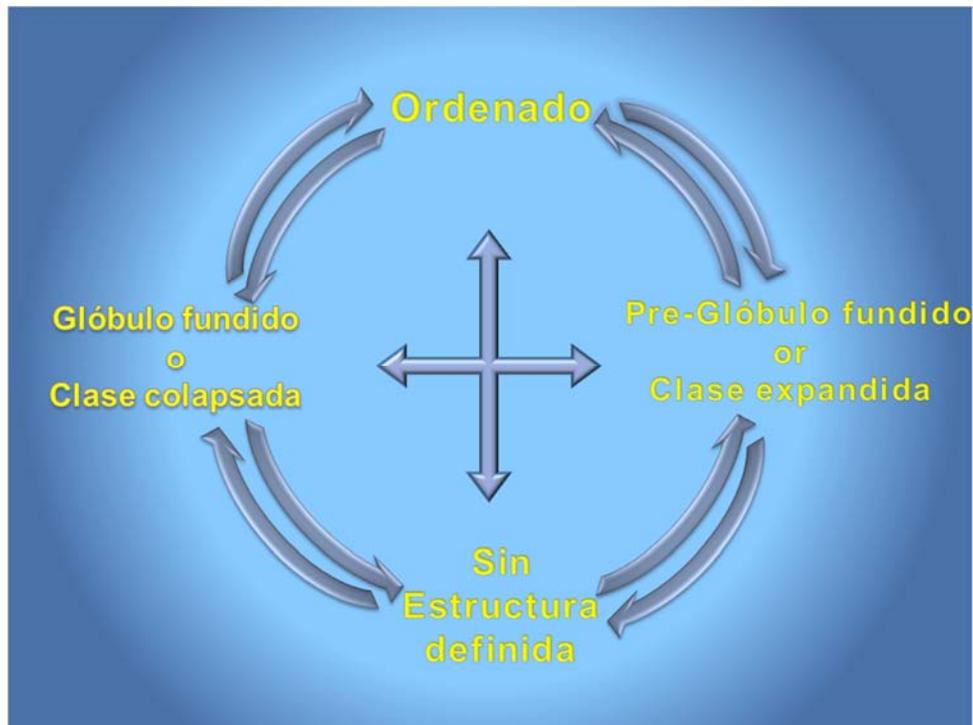
**Fig. 2.** Paisaje energético de proteínas agregadas. A diferencia del embudo de plegamiento para proteínas nativas, cuando existe una alta concentración de polipéptido se presentan otro tipo de interacciones que originan agregación. Las regiones caracterizadas por una baja energía y entropía son características de especies que se encuentran ordenadas, tales como las fibras y los cristales.

Actualmente es bien conocido que la estructura primaria del polipéptido es un factor clave durante el proceso de agregación, mientras que el microambiente que rodea la proteína es un factor determinante en el proceso de plegamiento [6]. Por otra parte las proteínas nativamente desplegadas, conocidas por carecer de estructuras secundarias y terciarias permanentes, presentan la tendencia a organizarse en

estructuras amiloidogénicas. Este es el caso de la  $\alpha$ -sinucleína, una proteína encontrada en los cuerpos de Lewy depositados en el cerebro de pacientes afectados con la enfermedad de Parkinson [7]. En el caso de las enfermedades por priones, la proteína PrP ha sido aislada a partir de las placas amiloides, en la que se observó un cambio conformacional de una hélice- $\alpha$  a hoja- $\beta$  [8]. Este cambio conformacional genera un mecanismo tipo molde, en donde se induce también una conformación de hoja- $\beta$  a otras proteínas cercanas con estructura nativa. Teniendo en cuenta que el estado nativo se encuentra en el mínimo más bajo del embudo de plegamiento, esta región contiene la conformación termodinámicamente más estable para el polipéptido en condiciones fisiológicas. Para las proteínas cuyo estado funcional es una estructura globular compacta, un proceso de desplegamiento parcial o total es menos factible, lo cual les confiere una protección contra la agregación [8]. Por esta razón, muchas de las formas conocidas de enfermedades amiloides se han asociado con mutaciones genéticas que decrecen la estabilidad de las proteínas y promueven un desplegamiento que posteriormente se reorganiza en estructuras- $\beta$ . Este mecanismo asocia a las enfermedades amiloidogénicas a transiciones conformacionales del tipo desorden-orden. En un trabajo de Chen S, *et al.* se demostró que la poliglutamina monomérica en solución representa un centro de nucleación para la generación de agregados con una conformación de hoja- $\beta$ , los cuales se generan inicialmente por una transición desorden-orden [9]. Existen varios artículos que proporcionan una caracterización cuantitativa de estas fluctuaciones tipo desorden-orden mediante simulaciones de dinámica molecular con péptidos de poliglutamina. El primer trabajo que presentó evidencias experimentales sobre las transiciones de tipo desorden-orden, corresponde a la descripción de la conversión de tripsinógeno a tripsina

publicado hace 30 años [10]. Este mecanismo se caracteriza por la eliminación enzimática de un hexapéptido de la región N-terminal de tripsinógeno con el fin de formar tripsina. La deleción del hexapéptido promueve una transición de un estado desordenado del sitio de interacción en el tripsinógeno a un estado ordenado en la tripsina. Estas transiciones desorden-orden pueden llevarse a cabo tanto en proteínas completas o péptidos los cuales carecen de estructuras terciarias definidas una vez que se unen a uno o varios ligandos [11]. La capacidad que en general presentan las “proteínas desordenadas” de modular la estructura en función del microambiente y que esto permita la promoción de diversas funciones hace que sean propuestas como “interruptores moleculares” [12].

Por otro lado, Dunker y Obradovic [13] así como el grupo de Uversky [14] presentaron una definición ampliada sobre el paradigma proteína-función. Estos investigadores extienden la definición de proteína funcional considerando además de las proteínas con una estructura 3D ordenada, a aquellas con un alto porcentaje de estructura desordenada (Fig. 3). Un ejemplo de esto último sería el sitio de unión de la  $\alpha$ -sinucleína a iones metálicos di y trivalentes, que muestra una transición de estructura helicoidal a pre-glóbulo fundido [15]. Así mismo se ha observado el caso contrario en la proteína mielina, donde se da un arreglo estructural una vez que se une a lípidos partiendo de una estructura desordenada a una conformación de glóbulo fundido [16].



**Fig. 3.** Modelo de cuatro conformaciones para las transiciones estructurales en las proteínas.

Desde un punto de vista evolutivo, se ha propuesto que el desorden intrínseco podría ser el mecanismo por el cual se generó la capacidad de adaptación a varios procesos en proteínas [17]. Esta visión se refuerza al observar que va en incremento el número de proteínas que presentan regiones desordenadas relacionadas directamente con la función y por lo tanto con enfermedades, por esta razón, también ha surgido un interés en generar bancos de datos accesibles para mejorar el manejo de toda esta información. Con esta intención se creó la base de datos de proteínas desordenadas DisProt (por sus siglas de *Disorder Protein*) liberada en agosto del 2006 por el grupo de Dunker [18]. Desde entonces, otros sistemas se han creado para el estudio de proteínas desordenadas, tales como el algoritmo IPDA (por sus siglas de *Integrated*

*Protein Disorder Analyzer*) y AGGRESCAN que permiten identificar y predecir regiones desordenadas en proteínas [19,20].

### **Enfermedades asociadas a un plegamiento anómalo de proteínas**

En general, las regiones desordenadas en proteínas se han dividido en dos clases, la primera está relacionada con proteínas que retienen un bajo porcentaje de estructura secundaria junto con una estructura terciaria inestable durante el estado como glóbulo fundido, a la cual se le denominó clase colapsada. La segunda clase denominada de tipo extendido, corresponde a las proteínas que presentan un esqueleto altamente extendido similar a la estructura tipo hoja- $\beta$  [21]. Interesantemente, debido a que en muchos de estos casos se involucra funciones de señalización celular, existe una fuerte posibilidad de que transiciones desorden-orden en proteínas jueguen papeles de interruptores para determinadas funciones en la célula. Por otro lado, debido a la alta plasticidad estructural en las proteínas estas transiciones desorden-orden también podrían transformar o suprimir el lenguaje normal de la interacción proteína-proteína en uno aberrante. Por diversos estudios se ha observado que las transiciones conformacionales que forman complejos del tipo proteína-proteína o proteína-ligando se basan en un equilibrio entre alta especificidad y débil afinidad, acompañadas por una gran disminución de entropía conformacional. Este fenómeno permite que se amplíen las superficies de interacción, en comparación de las que se podrían obtener a partir de estructuras proteicas rígidas [22].

A pesar de la extraordinaria importancia de este tipo de transiciones, seguimos careciendo de estudios biofísicos detallados que puedan demostrar una estrecha

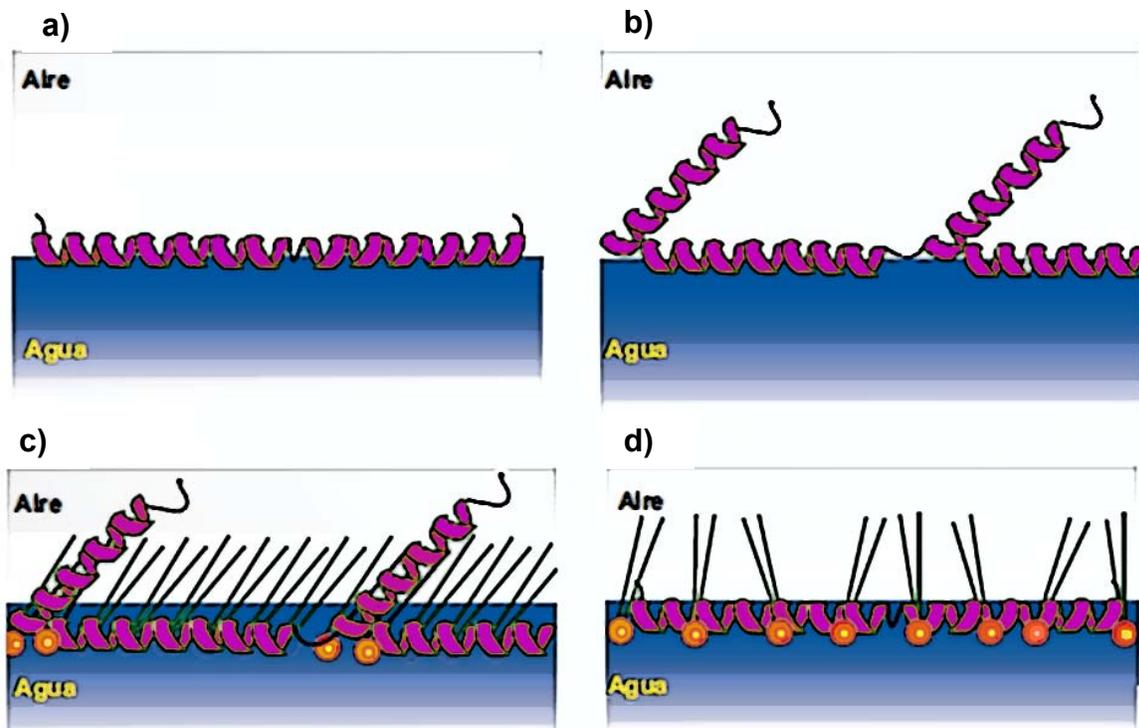
relación entre los cambios conformacionales del tipo desorden-orden y la función de proteínas. Durante los últimos años, sobre todo con el empleo de potentes algoritmos de bioinformática, muchas proteínas han mostrado un desorden intrínseco y se han estudiado en relación con enfermedades [23]. Un buen número de estas proteínas pueden ser consideradas como candidatos potenciales para el estudio y tratamiento de enfermedades cuando se reconocen en estos grupos dominios específicos que experimentan transiciones del tipo desorden-orden [23]. Un ejemplo corresponde a la proteína supresora de tumores p53, que es una de las proteínas más estudiadas en la historia. Se sabe que la p53 activa un gran número de genes, su función principal es la detención del ciclo celular en G1 y G2, lo que permite la activación de mecanismos de reparación del ADN y por lo tanto de propiedades inhibitorias de cáncer. Las personas que heredan sólo una copia funcional del gen p53 están predispuestos a desarrollar varios tipos de tumores. Más del 50 % de los cánceres humanos se han asociado con mutaciones en p53, y según el análisis sistemático de un gran número de mutaciones, se observó que 304 de las 882 mutaciones estudiadas que afectan el dominio central en la estructura de p53 pueden explicarse por sus efectos sobre el plegamiento de esta proteína [24].

### **Estructura de proteínas transferidoras de lípidos y su asociación a enfermedad**

En nuestro laboratorio, con la finalidad de dilucidar los mecanismos a través de los cuales apolipoproteínas como la ApoA-I y ApoC-I llevan a cabo estos fenómenos, nos enfocamos en el estudio de cambios conformacionales de apolipoproteínas en interfases aire/agua y lípido/agua. Para ello, hemos caracterizado las monocapas de Langmuir que se forman espontáneamente a partir de estas proteínas y las

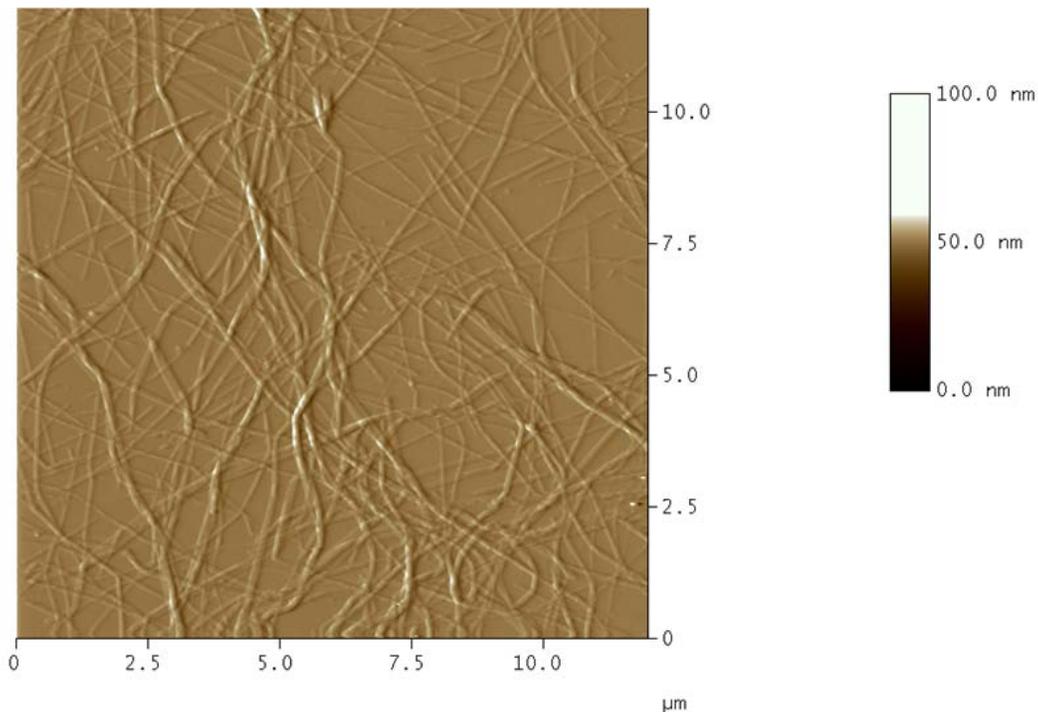
sometimos a diferentes presiones laterales. Por medio de técnicas biofísicas se observó la adsorción del segmento carboxilo terminal de ApoC-I hacia la fase hidrofóbica, el aire, o las cadenas de acilo en interfases con lípido (Fig 4). En nuestro interés por conocer si la estructura secundaria del segmento carboxilo de ApoC-I permanecía estable independientemente de su posición en las diferentes interfases hidrofílico/hidrofóbicas, se realizaron estudios de este segmento en diferentes ambientes, así como de otros dos péptidos derivados de esta misma proteína. En estos experimentos observamos que los segmentos peptídicos que responden a cambios de ambiente específicos, presentan transiciones de tipo desorden-orden [25]. Estos cambios conformacionales podrían funcionar como interruptores moleculares permitiendo que la proteína realice sus funciones de modulación enzimática y se pueda intercambiar entre las partículas lipoproteicas. Otra proteína que podría modular su función por medio de este tipo de cambios conformacionales

dinámicos es CETP, que también hemos estudiado en nuestro laboratorio. Estudios realizados por otros investigadores con un anticuerpo monoclonal específico para la región C-terminal de CETP, mostraron la importancia que tiene esta región helicoidal. En nuestro grupo se describió que este segmento de CETP, presenta un arreglo estabilizador entre 466H y 470D. También se planteó que la actividad de unión a lípidos puede ser producida por la distribución asimétrica de residuos polares/no polares y por la presencia de este arreglo estabilizador [26].



**Fig. 4.** Representación de monocapas de Langmuir de ApoC-I en interfaces aire/agua bajo presiones laterales bajas (a) y altas (b). Monocapas de Langmuir binarias de fosfatidilcolina/ApoC-I en interfaces lípido/agua a presiones laterales bajas (c) y altas (d). En este diagrama se representa la posible función de interruptor molecular de la región C-terminal al presentar cambios conformacionales dependiendo de la presión lateral a la que se somete.

Por otra parte, considerando el mismo enfoque con péptidos específicos sintetizados a partir de la secuencia de la ApoA-I, cuando se deja en agua a 4° C se desarrolla una transición desorden-orden muy lenta, inclusive por el transcurso de semanas, a partir de un estado completamente desordenado pasa a una estructura secundaria de hoja- $\beta$  [27]. Estos mismos péptidos en presencia de moléculas como TFE, SDS y lisofosfolípidos presentan conformaciones con un alto contenido de estructura hélice- $\alpha$ . Este comportamiento apoya el hecho de que las características fisicoquímicas del medio ambiente se deben considerar como un factor clave en el desplazamiento del equilibrio dentro de la estructura secundaria de una proteína o segmentos específicos hacia hélices- $\alpha$  o estructuras hoja- $\beta$  [28]. En este caso, el resultado de que los segmentos específicos de ApoA-I lentamente desarrollan estructuras fibrilares indica la posibilidad de que un proceso patológico tal como aterogénesis podría ser también considerado como una enfermedad relacionada a un proceso amiloidótico (Fig. 5) [29].



**Fig. 5.** Imagen de microscopía de fuerza atómica del péptido DRV derivado de la secuencia de la ApoA-I (aminoácidos 9-24).

### **Enfermedades de tipo amiloidogénicas**

En la actualidad, un número importante de enfermedades afectan varios tejidos y producen una serie de síntomas comunes debidos al depósito de proteínas en agregados insolubles [30]. Aunque no existe una absoluta conexión entre la formación de fibras amiloides y su toxicidad sobre las células *in vitro* [31], se cree que su efecto reside en procesos que permiten que estas proteínas generen estructuras del tipo hoja- $\beta$ . Independientemente de si la proteína precursora es sintetizada como una proteína normal, existen factores externos principalmente relacionados con el ambiente de la proteína durante la síntesis o durante su ruta al sitio blanco que detonan este potencial amiloidogénico. Por otro lado varios estudios han mostrado

que un cierto número de polipéptidos que no están relacionados directamente a enfermedades amiloides también presentan la propiedad de formar fibras amiloides bajo ciertas condiciones [32]. El hecho de que existan diferencias entre amiloides “funcionales” y los que están asociados a enfermedad puede explicarse en términos de mecanismos de regulación evolutiva, como es el caso de la proteína Pmel17 [33]. Ésta última, después de un proceso proteolítico genera un polipéptido denominado  $M\alpha$ , el cual sirve de soporte para que se lleve a cabo la polimerización de la melanina.

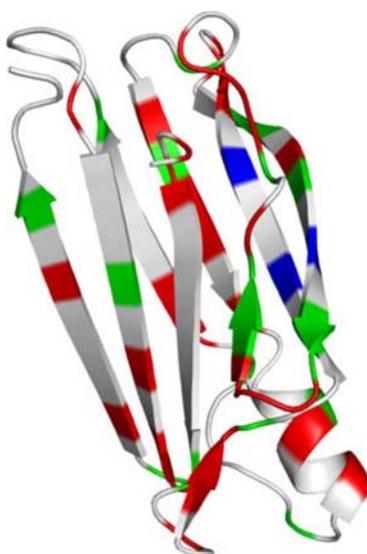
Debido a que muchos péptidos y proteínas del tipo amiloide corresponden a fragmentos de moléculas precursoras más grandes, se ha observado que usualmente un incremento de 1000 veces en la concentración plasmática de estos precursores es necesario para generar un depósito amiloide. Los procesos proteolíticos de estos precursores asociados a una serie de factores de tráfico y señalización alterados parece ser un factor crítico en la formación de depósitos amiloides [34]. La presencia de iones metálicos y la asociación con proteínas accesorias tales como apolipoproteínas y proteoglicanos sulfatados han mostrado la propiedad de modular la amiloidogénesis [35]. Muy probablemente las moléculas más comunes asociadas a proteínas amiloides son los proteoglicanos, los cuales contienen un gran número de cadenas de glicosaminoglicanos sulfatados. Estas moléculas se han sugerido como factores clave en la formación de placas amiloides maduras, ya que sirven de molde y escudo protector contra la proteólisis [36]. Varios subtipos se han asociado con placas del beta amiloide, como son heparina, dermatán, queratina y proteoglicanos de condroitín sulfato [37]. Dentro de las proteínas con mayor potencial para generar fibras amiloides se encuentra la proteína precursora del  $\beta$  amiloide ( $A\beta$ PP, del *inglés amyloid  $\beta$  precursor protein*).  $A\beta$ PP es una proteína transmembranal con un bajo

potencial amiloidogénico *in vitro*, sin embargo existen tres mutantes de esta proteína en los aminoácidos 695V, 751K y 770N que bajo un proceso de proteólisis por la  $\alpha$ -secretasa forma un ectodominio soluble con la retención de un fragmento del C-terminal en la membrana. De manera secundaria a la acción de la  $\alpha$  y  $\beta$  secretasas se libera un péptido denominado  $\beta$  amiloide, el cual es altamente amiloidogénico. Se ha observado que el  $\beta$  amiloide promueve un importante estado oxidativo en la célula [38] y posteriormente genera Alzheimer, la enfermedad más común entre las personas de edad avanzada. Dentro del grupo de proteínas que generan enfermedades crónicas neurodegenerativas se encuentran la proteína PrP, cuyas isoformas se acumulan en el cerebro. Entre las enfermedades que genera se encuentra la enfermedad de “*scrapie*” en ovejas y cabras, la encefalopatía esponjiforme en ganado y en humanos produce la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, Gerstmann-Sträusler-Scheiker y la encefalopatía amiloide cerebral por PrP. La función de PrP<sup>c</sup> permanece desconocida pero se plantea que podría estar involucrada en procesos de sinapsis [39].

### **Amiloidosis de nervios periféricos y transteritina (TTR)**

La amiloidosis nerviosa de tipo periférica es frecuente en la polineuropatía amiloide familiar (FAP, por sus siglas de *Familial Amyloid Polyneuropathy*) [40]. FAP es un grupo heterogéneo de desórdenes autosómicos dominantes caracterizados por la deposición de la proteína fibrilar asociada con la proteína Transteritina (TTR) en forma de amiloide [41]. La proteína TTR es un homotetrámero de 127 residuos cuya función es transportar en el plasma tiroxina y vitamina A. Sin embargo, varias mutaciones en TTR causan deposición tejido-selectivo (Fig.6) [24], las bases clínicas

para la manifestación predominante de cada mutación aún no ha sido establecida. Sin embargo la patogénesis se ha asociado con la disociación del tetrámero nativo en especies parcialmente desplegadas, las cuales pueden subsecuentemente autoensamblarse en la forma de fibra amiloide. FAP también puede generarse de forma secundaria a la deposición de la ApoA-I y de la proteína gelsolin, donde dos mutantes descritas en el gen de gelsolin han sido directamente asociadas a este tipo de enfermedades [42].

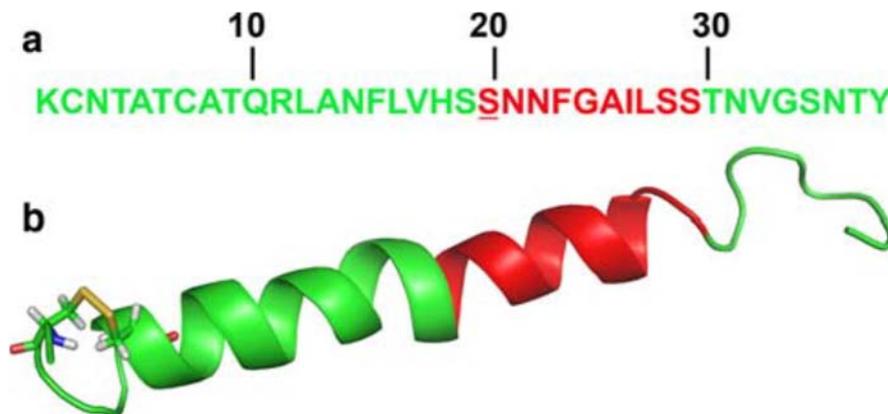


**Fig. 6.** Estructura tridimensional del monómero de transteritina por difracción de rayos X. En color se muestra la posición de regiones con las mutaciones amiloidogénicas más comunes. El color blanco representa regiones libre de mutaciones, rojo es una mutación, verde de dos a tres, azul cuatro o más mutaciones. Código PDB: 1rlb, la imagen está visualizada con Pymol.

### **Polipéptido amiloide de islote (IAPP) y $\beta$ 2 microglobulina ( $\beta$ 2m)**

La proteína Amilina o IAPP (del inglés *Islet Amyloid Polypeptide*) es sintetizada en las células- $\beta$  de los islotes pancreáticos y sufre una serie de modificaciones post-transduccionales para producir una proteína madura de 37 aminoácidos (Fig. 7)

[43]. IAPP es una molécula involucrada en la modulación del metabolismo de glucosa así como el metabolismo del calcio. Los agregados de IAPP son el componente primario de los depósitos amiloides encontrados en las células- $\beta$  pancreáticas de



**Fig. 7.** Estructura tridimensional de la amilina humana. **a)** Estructura primaria de la proteína completa (1K-37Y) se muestra en rojo la región amiloidogénica que está entre 20S y 29S. **b)** Estructura secundaria de la amilina determinada por RMN en presencia de micelas de SDS. Código PDB: 2kb8, imagen visualizada con Pymol.

pacientes con diabetes mellitus tipo 2 [44]. El oligómero prefibrilar de IAAP ha mostrado tener la propiedad de permear en las membranas a través de mecanismos tipo poro, sugiriendo que esta proteína podría estar relacionada a un mecanismo patogénico involucrado en la génesis de diabetes mellitus no insulino-dependiente (tipo II) [45]. La  $\beta$ 2m es una proteína encontrada en una asociación no covalente de las cadenas pesadas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC I). La  $\beta$ 2m se encuentra normalmente en plasma y posteriormente es transportada a los riñones donde es degradada y excretada [46]. Debido a una disfunción renal, la concentración de  $\beta$ 2m en plasma puede incrementarse arriba de 60 veces, por lo que

se acumula como estructuras filamentosas en tejidos conectivos generando amiloidosis relacionada con diálisis [47]. Sin embargo, se sabe que la disociación del MHCII predispone a una amiloidosis transitoria por  $\beta_2m$  [48], el mecanismo por el cual la  $\beta_2m$  genera fibrillogénesis *in vivo* todavía permanece desconocido.

## **Conclusión**

La medicina ha demostrado que muchas enfermedades tienen su origen en la forma en que las proteínas llevan a cabo cambios estructurales donde emplean transiciones desorden-orden y orden-desorden los cuales son finamente sincronizados. Teniendo en cuenta que varias estructuras de tipo amiloide son funcionales y se han caracterizado en bacterias, hongos, insectos y mamíferos observamos que existe un consenso para la formación de fibras amiloides lo cual representa un camino evolutivo bien conservado en la estructura de proteínas [49]. Por lo tanto, las diferencias entre amiloides "funcionales" y "patológicos" podrían simplemente residir en las vías moduladoras involucradas a lo largo de su síntesis. Como el profesor Christopher M. Dobson declaró: *"Las enfermedades amiloides son resultado de la reversión de formas biológicamente funcionales y altamente evolucionadas de proteínas en una estructura alternativa no deseada, que existe como resultado de la inherente fisicoquímica de las cadenas polipeptídicas..."* [8]. Sin lugar a dudas podemos afirmar que en el futuro cercano, muchas enfermedades de origen desconocido encontrarán su explicación en la forma en que esta clase de fenómenos se regulan.

Una vez que revisamos varios ejemplos de proteínas con plegamiento anómalo nos enfocaremos nuevamente en nuestro modelo de estudio que son las apolipoproteínas. En forma muy concreta en el siguiente capítulo estudiaremos los mecanismos por los cuales la ApoA-I nativa o modificada puede generar procesos anómalos como la agregación y por tanto desarrollar en el humano amiloidosis.

### Referencias

1. Beretta L. Proteomics from the clinical perspective: many hopes and much debate, *Nat. Methods* 4 (2007) 785-786.
2. Rose GD, Fleming PJ, Banavar JR, Maritan A. A back-bone-based theory of protein folding, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 103 (2006) 16623-16633.
3. Huang K. Lectures on statistical physics and protein folding. World Scientific, New Jersey, 2005.
4. Dobson CM. Protein folding and misfolding, *Nature* 426 (2003) 884-890.
5. Eisenberg D, Nelson R, Sawaya MR, Balbirnie M, Sambashivan S, *et al.* The structural biology of protein aggregation diseases: fundamental questions and some answers, *Acc. Chem. Res.* 39 (2006) 568-575.
6. Fink AL. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid, *Fold Des.* 3 (1998) R9-R23.
7. Chandra S, Chen X, Rizo J, Jahn R, Sudhof TC. A broken alpha-helix in folded alpha-synuclein, *J. Biol. Chem.* 278 (2003)15313-15318.
8. Dobson CM. Protein chemistry: in the footsteps of alchemists, *Science* 304 (2004) 1259-1262.
9. Chen S, Ferrone FA, Wetzel R. Huntington's disease age-of-onset linked to polyglutamine aggregation nucleation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99 (2002) 11884-11889.
10. Huber R, Bode W. Structural basis of the activation and action of trypsin, *Acc. Chem. Res.* 11 (1978) 114-122.
11. Tompa P. Intrinsically unstructured proteins, *Trends Biochem. Sci.* 27 (2002) 527-533.
12. Bustos DM, Iglesias AA. Intrinsic disorder is a key characteristic in partners that bind 14-3-3 proteins, *Proteins* 63 (2006) 35-42.
13. Dunker AK, Obradovic Z. The protein trinity-linking function and disorder, *Nat. Biotechnol.* 19 (2001) 805-806.
14. Uversky VN. Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics, *Protein Sci.* 11 (2002) 739-756.
15. Pagel K, Vagt T, Koksche B. Directing the secondary structure of polypeptides at will: from helices to amyloids and back again? *Org. Biomol. Chem.* 3 (2005) 3843-3850.
16. Pulverini E, Fasano A, Zito F, Riccio P, Cavatorta P. Conformation of bovine myelin basic protein purified with bound lipids, *Eur. Biophys. J.* 28 (1999) 351-355.
17. Dunker AK, Garner E, Guillot S, Romero P, Albrecht K, *et al.* Protein disorder and the evolution of molecular recognition: theory, predictions and observations, *Pac. Symp. Biocomput.* (1998) 473-484.
18. Sickmeier M, Hamilton JA, LeGall T, Vacic V, Cortese MS, *et al.* DisProt: the database of disordered proteins, *Nucleic. Acids Res.* 35 (2007) D786-D793.
19. Su C-T, Chen C-Y, Hsu C-M. iPDA: integrated protein disorder Analyzer, *Nucleic. Acids. Res.* 35 (2007) W465-W472.
20. Conchillo-Solé O, de Groot NS, Avilés FX, Vendrell J, Daura X, Ventura S. AGGRESCAN: a server for the prediction and evaluation of "hot spots" of aggregation in polypeptides, *BMC Bioinformatics* 8 (2007) 65.
21. Uversky VN. What does it mean to be natively unfolded? *Eur. J. Biochem.* 269 (2002) 2-12.
22. Cheng Y, LeGall T, Oldfield CJ, Mueller JP, Van YY, *et al.* Rational drug design via intrinsically disordered protein, *Trends Biotechnol.* 24 (2006) 435-442.

23. Xie Q, Arnold GE, Romero P, Obradovic Z, Garner E, Dunker AK. The sequence attribute method for determining relationships between sequence and protein disorder, *Genome Inform. Ser. Workshop Genome Inform.* 9 (1998) 193-200.
24. Martin AC, Facchiano AM, Cuff AL, Hernandez-Boussard T, Olivier M, *et al.* Integrating mutation data and structural analysis of the TP53 tumor-suppressor protein, *Hum. Mutat.* 19 (2002) 149-164.
25. Mendoza-Espinosa P, Moreno A, Castillo R, Mas-Oliva J. Lipid dependant disorder-to-order conformational transitions in apolipoprotein C-I derived peptides, *Biochem Biophys. Res. Commun.* 365 (2008) 8–15.
26. García-González V, Mas-Oliva J. Amyloidogenic Properties of a D/N mutated 12 amino acid fragment of the C-terminal domain of the cholesteryl-ester transfer protein (CETP), *Int. J. Mol. Sci.* 12 (2011) 2019-2035.
27. Mendoza-Espinosa P, Montalvan-Sorrosa D, Garcia-Gonzalez V, Moreno A, Castillo R, Mas-Oliva J. Microenvironmentally controlled secondary structure motifs of apolipoprotein A-I derived peptides, *Mol. Cell. Biochem.* 393 (2014) 99-109.
28. Andreola A, Bellotti V, Giorgetti S, Mangione P, Obici L, *et al.* Conformational switching and fibrillogenesis in the amyloidogenic fragment of apolipoprotein A-I, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 2444-2451.
29. Westermark P, Mucchiano G, Marthin T, Johnson KH, Sletten K. Apolipoprotein AI-derived amyloid in human aortic atherosclerotic plaques, *Am. J. Pathol.* 147 (1995) 1186-1192.
30. Ban T, Hoshino M, Takahashi S, Hamada D, Hasegawa K, *et al.* Direct observation of A $\beta$  amyloid fibril growth and inhibition, *J. Mol. Biol.* 344 (2004) 757-767.
31. Manzano-León N, Mas-Oliva J. Estrés oxidativo, péptido  $\beta$ -amiloide y enfermedad de Alzheimer, *Gac. Med. Mex.* 142 (2006) 229-238.
32. Gross M, Wilkins DK, Pitkeathly MC, Chung EW, Higham C, *et al.* Formation of amyloid fibrils by peptides derived from the bacterial cold shock protein, *CspB Protein. Sci.* 8 (1999) 1350-1357.
33. Berson JF, Theos AC, Harper DC, Tenza D, Raposo G, Marks MS. Proprotein convertase cleavage liberates a fibrillogenic fragment of a resident glycoprotein to initiate melanosome bio-genesis, *J. Cell. Biol.* 161(2003) 521-533.
34. von Arnim CA, Spoelgen R, Peltan ID, Deng M, Courchesne S, *et al.* GGA1 acts as a spatial switch altering amyloid precursor protein trafficking and processing, *J. Neurosci.* 26 (2006) 9913-9922.
35. Magaki S, Raghavan R, Mueller C, Oberg KC, Vinters HV, Kirsch WM. Iron, copper, and iron regulatory protein 2 in Alzheimer's disease and related dementias, *Neurosci. Lett.* 418 (2007) 72-76.
36. Snow AD, Wight TN. Proteoglycans in the pathogenesis of Alzheimer's disease and other amyloidoses, *Neurobiol. Aging.* 10 (1989) 481-497.
37. Arrasate M, Pérez M, Valpuesta JM, Avila J. Role of glycosaminoglycans in determining the helicity of paired helical filaments, *Am. J. Pathol.* 151 (1997) 1115-1122.
38. Manzano-León N, Delgado-Coello NB, Guaderrama-Díaz M, Mas-Oliva J. Beta-adaptin: key molecule for microglial scavenger receptor function under oxidative stress, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 351 (2006) 588-594.
39. Bueler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, *et al.* Normal development and behavior of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein, *Nature* 356 (1992) 577-582.
40. Hou X, Aguilar MI, Small DH. Transthyretin and familial amyloidotic polyneuropathy. Recent progress in understanding the molecular mechanism of neurodegeneration, *FEBS J.* 274 (2007) 1637-1650.
41. Jacobson DR, Pastore RD, Yaghoubian R, Kane I, Gallo G, *et al.* Variant-sequence transthyretin (isoleucine 122) in late-onset cardiac amyloidosis in black Americans, *N. Engl. J. Med.* 336 (1997) 466-473.
42. Levy E, Haltia M, Fernandez-Madrid I, Koivunen O, Ghiso J, Prelli F, Frangione B. Mutation in gelsolin gene in Finnish hereditary amyloidosis, *J. Exp. Med.* 172 (1990) 1865–1867.
43. Bhattacharya S, Latha JN, Kumresan R, Shashi S. Cloning and expression of human islet amyloid polypeptide in cultured cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 365 (2007) 8-15.
44. Nilsson MR, Raleigh DP. (1999) Analysis of amylin cleavage products provides new insights into the amyloidogenic region of human amylin, *J. Mol. Biol.* 94 (1999) 1375-1385.
45. Anguiano M, Nowak RJ, Lansbury PT. Protofibrillar islet amyloid polypeptide permeabilizes synthetic vesicles by a pore- like mechanism that may be relevant to type II diabetes, *Biochemistry* 41 (2002) 11338-11343.
46. Rosano C, Zuccotti S, Bolognesi M. The three-dimensional structure of b2 microglobulin: results from X ray crystallography, *Biochim. Biophys. Acta* 1753 (2005) 85-91.
47. Floege J, Ehlerding G. Beta-2-microglobulin associated amyloidosis, *Nephron.* 72 (1996) 9-26.

48. Gouin-Charnet A, Mourad G, Argilés A. Alpha 2-macroglobulin protects some of the protein constituents of dialysis-associated amyloidosis from protease degradation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 231 (1997) 48-51.
49. Kelly JW, Balch WE. Amyloid as a natural product, *J. Cell. Biol.* 161 (2003) 461-462.

# **Estructura, función y propensión amiloidogénica de la Apolipoproteína A-I**

**Tomado de:**

***Conformational and disorder to order transitions in  
proteins. Structure/function correlation in apolipoproteins,  
In Protein Interaction/Book 2, (2012) In Tech – Open Acces Publisher.***

## Estructura y función de la ApoA-I

La ApoA-I pertenece a las lipoproteínas intercambiables, lo que le permite moverse entre diferentes partículas lipoproteicas. Debido a la importancia de la ApoA-I en el TRC se ha pensado que es la proteína con la mayor función antiaterogénica lo que significa una protección contra el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. La ApoA-I es sintetizada en el hígado y en segundo lugar en el intestino como una pre-proteína. Posterior al corte del pre- y pro péptido, se genera una proteína de 243 aminoácidos los cuales son codificados por el exón 3 (residuos 1D-43N) y exón 4 (residuos 44L-243Q) localizados en el brazo largo del cromosoma 11 (Fig.1). La regulación transcripcional del gen de la ApoA-I es algo complejo y está influenciado por factores genéticos como polimorfismos en la secuencia del promotor, así como factores hormonales y nutricionales [1,2]. La proteína madura (28 kDa) es secretada en el plasma, donde puede encontrarse asociada a lípido o en estado libre (5-10%) [3]. Durante la biogénesis de la HDL, el principal aceptor de colesterol y fosfolípidos de macrófagos es la ApoA-I libre de lípido. Como se ha comentado en capítulos anteriores la ApoA-I está conformada principalmente por hélices- $\alpha$  de tipo anfipáticas [4,5]. Un análisis detallado por RMN en medio mimético a lípido, muestra que el segmento N-terminal, constituido por los residuos 1D al 43N, presenta segmentos desestructurados específicamente en los residuos 1D al 7P y 33F al 44L, éste último separa el dominio N-terminal del resto de la molécula [6]. Las hélices- $\alpha$  se proponen como las regiones que podrían estar mediando las diferentes funciones de la proteína, como la unión de lípidos [4], activación de LCAT [7], estimulación del flujo de colesterol de células [8] y la interacción con receptores [9].

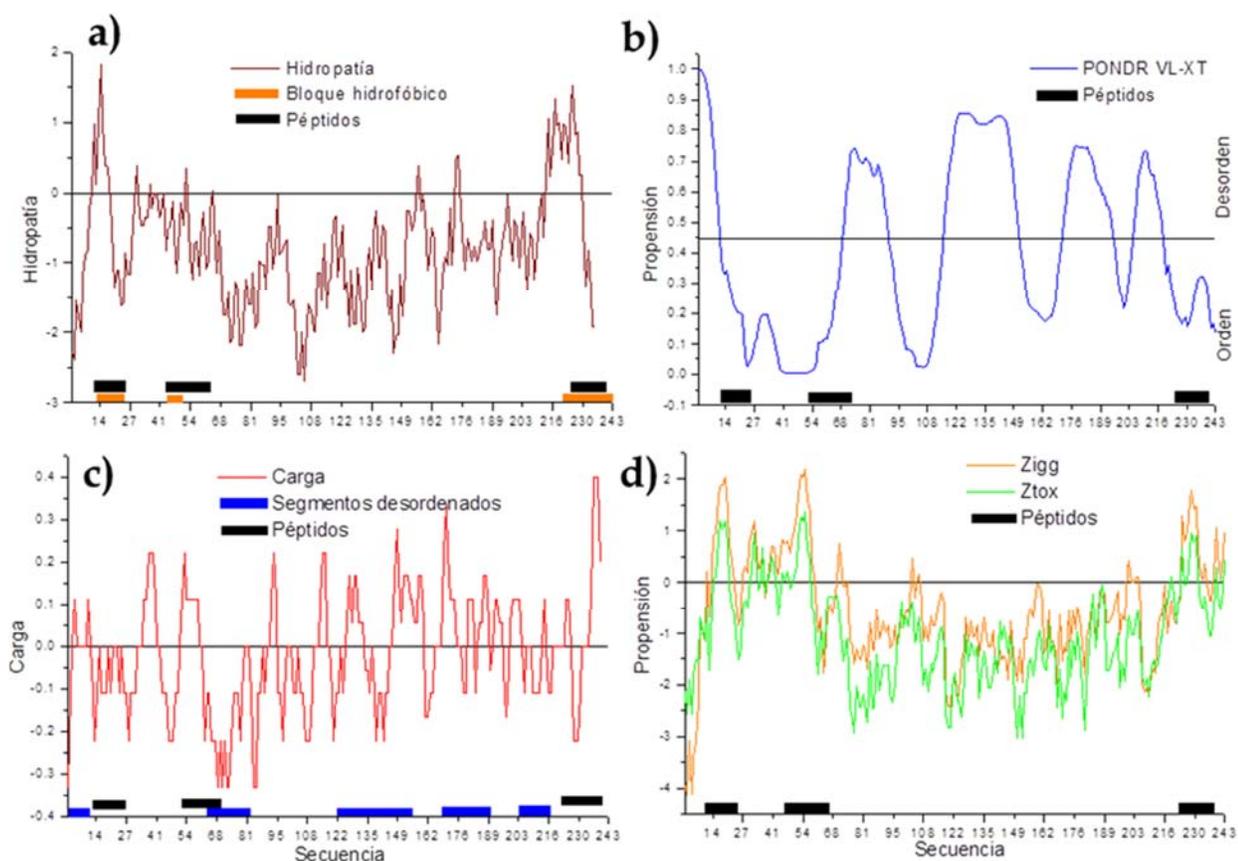


**Fig. 1.** Dominios estructurales de la ApoA-I. La ApoA-I contiene un dominio globular en el segmento N-terminal codificado por el exón 3 y otro de unión a lípido codificado por el exón 4. El dominio globular presenta una hélice del tipo G\* y el dominio de unión a lípido 10 hélices- $\alpha$ , clases tipo A y Y.

### Interacción ApoA-I/lípido

En varios estudios se ha evaluado la interacción proteína-lípido de cada una de las hélices que conforman a la ApoA-I, notando que el extremo N-terminal determina la estructura abierta o cerrada de la proteína. Este proceso es modulado por la presencia de colesterol obtenido por la interacción con la proteína ABCA1, dando lugar a la HDL naciente. Así mismo debido a su alta hidrofobicidad, el dominio C-terminal de ApoA-I facilita el anclaje a membranas [10]. Estos estudios son basados en el modelo ampliamente aceptado para la HDL discoidal, la cual corresponde a un disco hecho de una bicapa rodeado por moléculas de ApoA-I helicoidales en donde su eje X es perpendicular a las cadenas acílicas de los fosfolípidos [11]. Estas propiedades pueden ser fácilmente observadas en el perfil de hidrofobicidad de ApoA-I obtenido con el algoritmo EMBOSS Pepinfo, empleando una ventana de 9

aminoácidos y la escala de Kyte J. & Doolittle RF. [12] (Fig.2a). El perfil negativo es característico de proteínas de membrana, sin embargo, las regiones del segmento N y C-terminal de la proteína (10R-17V, 213D-229F), indican una alta hidrofobicidad. Por otro lado, el uso del algoritmo HCA para ubicar parches hidrofóbicos, el cual considera en la proteína una estructura secundaria hélice- $\alpha$  mostró tres segmentos altamente hidrofóbicos (13D-22L, 45K-49N y 216Q-232L), (Fig. 2a, grupos hidrofóbicos) [13]. La distribución en la hélice de aminoácidos negativos, positivos o neutros, genera diferentes tipos de hélices presentes en la ApoA-I. Este cambio en la distribución de aminoácidos en la proteína es lo que le otorga la capacidad de asociarse a lípidos. Por ejemplo, los segmentos que corresponden a las hélices 1 y 2 son tipo A, las hélices 9 y 10 son tipo Y. Los dos tipos de hélices presentan la característica de tener la mayor afinidad a lípido dentro de la estructura de la ApoA-I.



**Fig. 2.** Métodos empleados en la predicción de desorden, agregación y propensión de formación de fibras amiloides basado en la secuencia de la ApoA-I nativa. a) Perfil de hidrofobicidad calculado con el servidor EMBOSS:Pepinfo, usando una ventana de 9 aa y la escala hidrofóbica de Kyte & Doolittle, línea roja. Los bloques hidrofóbicos calculados con el servidor HCA, recuadro naranja. Posición de los péptidos DRV<sup>(9-24)</sup>, KLL<sup>(45-63)</sup> y VLES<sup>(221-239)</sup> en la secuencia de ApoA-I, recuadro negro. b) Perfil de desorden determinado por el servidor PONDR (PONDR VL-XT). c) Perfil de carga calculado con el servidor EMBOSS: usando una ventana de 9 aminoácidos. d) Propensión de formación de fibras amiloides con el servidor Ziggregator (Zigg) y formación de estructuras globulares (Ztox).

Por otro lado, en dos estudios espectroscópicos enfocados en los dominios N y C-terminal de la ApoA-I con la técnica de RPE, se observó dos segmentos con

estructura- $\beta$  [14,15]. Este resultado es interesante, debido a que la estructura cristalina así como las predicciones de estructura secundaria indican solo la presencia de estructura hélice- $\alpha$  en estos segmentos de la ApoA-I. La posibilidad de cambios conformacionales, sobre todo en presencia de lípidos también se ha observado en otras proteínas como la unidad fusogénica HA2 de la hemaglutinina del virus de la influenza. La proteína HA2 corresponde a un segmento de 36 aminoácidos que presenta la capacidad de realizar transiciones desorden-orden, de un segmento desordenado a una conformación hélice- $\alpha$ . La presencia de estos cambios conformacionales en la ApoA-I en presencia de lípido podría servir como un mecanismo para decrecer la barrera energética en su interacción con estas moléculas, un paso crucial en el flujo de colesterol y ensamble de la HDL.

### **Desorden intrínseco en la ApoA-I**

La ApoA-I es considerada dentro del grupo de las proteínas nativamente desestructuradas [16] y por la relevancia clínica que han cobrado se acuñó el término en inglés “*unfoldomic*”. Estas proteínas están asociadas a enfermedades tales como amiloidosis, cáncer, diabetes, enfermedades neurodegenerativas y otras. Se ha observado con varias técnicas como RMN y RPE que el N-terminal de ApoA-I libre de lípido presenta una gran movilidad y variabilidad en su estructura secundaria [6,8,14,17-20]. Mediante el uso del algoritmo PONDR con la secuencia nativa de esta proteína, se predijo la presencia de cinco segmentos altamente desordenados (Fig.2b). El primer segmento (1D-10R) corresponde al sitio que podría servir como sensor de unión a lípido cuando la ApoA-I está unida a la partícula discoidal [21]. El segundo sitio (69Q-89D) tiene una particular carga negativa en comparación a los

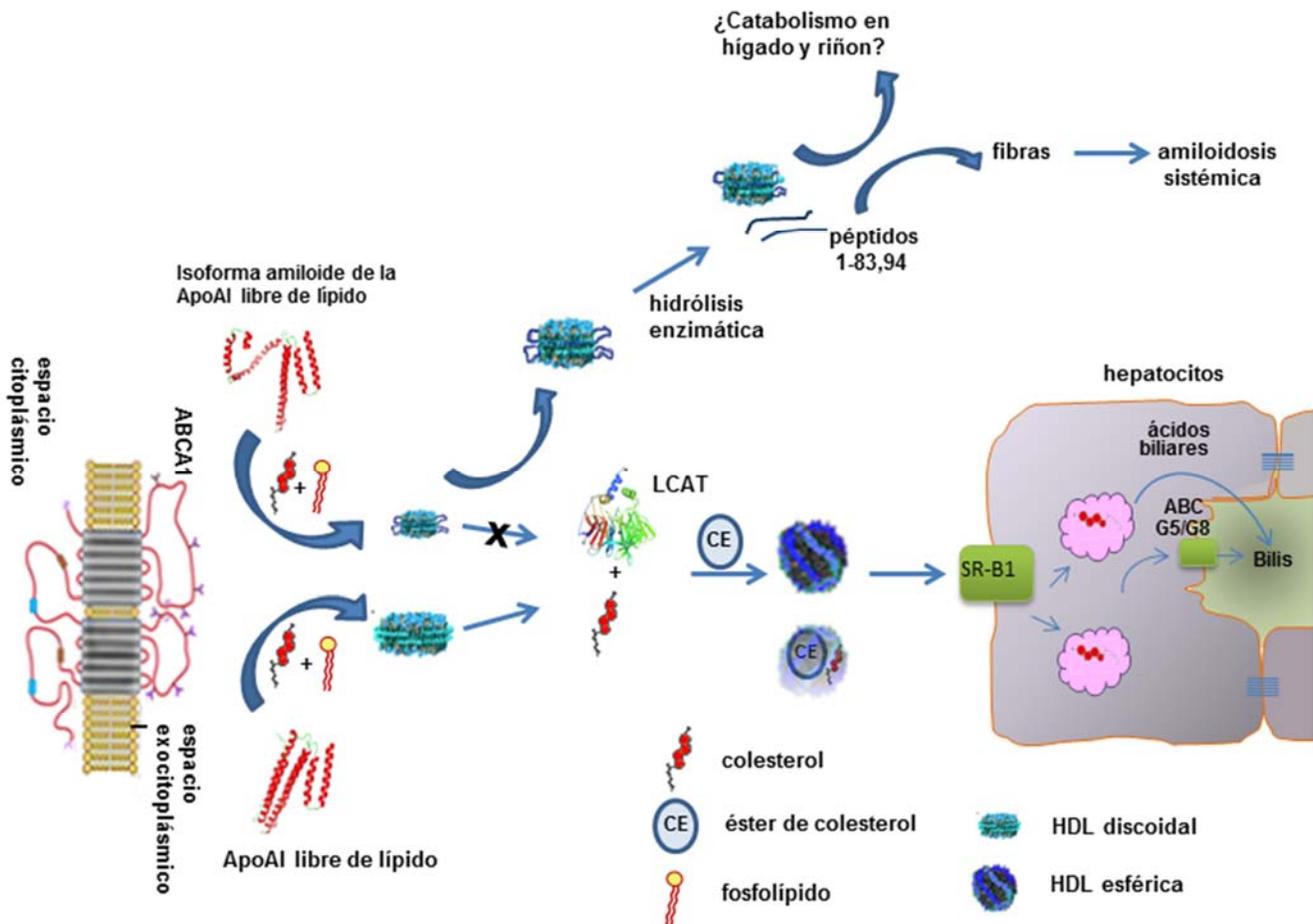
otros sitios desordenados (Fig. 2c). Este sitio también presenta la característica de ser una transición entre una hélice tipo A y tipo Y, lo cual se ha postulado que podría ser un factor desestabilizante en la continuidad de la estructura secundaria de una hélice- $\alpha$ . El tercer segmento, que además de ser el más largo, es el que tiene mayor propensión al desorden (aa 116K-150D) y coincide con un segmento propuesto como de bisagra en el modelo de HDL discoidal propuesto por Wu. Z. *et al.* 2007 [21]. Este mismo modelo presenta un asa (aa 159L-180A) que está incluida dentro del cuarto segmento desordenado (aa 172L-194A). Además este segmento también está relacionado con el sitio propuesto para la interacción ApoA-I/LCAT (159L-170L). El quinto segmento desordenado está localizado en una región de transición de una hélice tipo A a una hélice de tipo Y. Aunque se observa que en la estructura cristalina de ApoA-I este segmento está completamente estructurado en hélice- $\alpha$ , mediante estudios de RPE se observó una estructura  $\beta$ , el cual se propone podría servir como un mecanismo para facilitar la interacción con lípidos. Por otro lado se ha observado *in vivo* la presencia de bajas concentraciones de un segmento de 10 kD del N-terminal de la ApoA-I nativa, mismo que posteriormente genera fibras del tipo amiloide[22]. Las fibras amiloides están constituidas por estructuras  $\beta$ -cruzada que a su vez producen hojas- $\beta$  orientadas en una forma perpendicular con respecto al eje longitudinal de la fibra, resultando en un proceso de extensión. Subsecuentemente, protofibrillas se asocian de manera lateral para formar fibras de diámetros mayores. Por medio de un análisis de la secuencia nativa de la ApoA-I empleando el servidor Zigggregator [23], se observó que esta proteína presenta varios sitios con propensión a formar fibras amiloides:15A-20D, 50W-57F y 224S-230L (Fig. 2d, Zigg). Este servidor usa un algoritmo que considera patrones de hidrofobicidad, aminoácidos polares y el

contenido aromático que se han observado en proteínas amiloidogénicas. Los segmentos con propensión a la agregación en la ApoA-I presentan secuencias con bloques altamente hidrofóbicos compuestos de seis a siete aminoácidos flanqueados por cargas negativas o positivas. Este algoritmo también puede identificar secuencias que teóricamente presentan tendencia a formar estructuras globulares, las cuales se han observado son un paso importante en la formación de fibras amiloides. En este sentido, por estructuras globulares nos referimos a los agregados de proteína con una morfología esférica. Realizando experimentos *in vitro* con proteínas amiloides que generan este tipo de estructuras en condiciones estables, se observó que podrían estar involucradas en procesos de citotoxicidad celular debido a la formación de poros en las membranas [24]. Los segmentos de secuencia de ApoA-I propensos a formar estructuras amiloides calculados con el servidor Zyggregator, también muestran una capacidad de formar estructuras de tipo fibrilar (Fig.2d, Ztox). En estos experimentos nuevamente trabajamos con los péptidos DRV<sup>(9-24)</sup> y KLL<sup>(45-63)</sup> ambos localizados en el extremo N-terminal de ApoA-I y VLES<sup>(221-239)</sup> que se encuentra en el segmento C-terminal.

### **ApoA-I amiloidogénica**

Interesantemente dentro de las mutantes existentes en la ApoA-I, un grupo de 4 isoformas están asociadas con amiloidosis sistémica hereditaria. Las mutaciones corresponden a 26G→R, 60L→R, 50W→R y una delección/inserción del segmento (60L-71F)→(V-V-T). Considerando la estructura de la ApoA-I libre de lípido propuesta por Ajees *et al.* 2006 [4], estas mutantes generalmente proveen de carga positiva a la interfase hidrofóbica formada entre los dos pares de hélices del segmento N-terminal

(1D-188R). El introducir un residuo polar debido a las mutaciones en la interfase hidrofóbica de la ApoA-I libre de lípido probablemente interviene en la formación de este grupo de cuatro hélices en el segmento N-terminal. Esto también modifica la formación de parches hidrofílicos en este dominio, los cuales se han propuesto como motivos claves para la interacción de ApoA-I con ABCA1, proteína de membrana que la provee de colesterol y fosfolípidos. Esta interacción es crucial en la transición de HDL discoidal a esférica. Las partículas HDL discoidales generadas por isoformas de ApoA-I son rápidamente catabolizadas y no llegan hasta la partícula esférica [10]. Es importante mencionar que la ruta metabólica de las isoformas de ApoA-I las cuales generan depósitos amiloides no ha sido elucidada. Sin embargo, cualquiera de estas mutantes que se ubican en la hélice 1 y hélice G\* de ApoA-I podrían generar un asa susceptible a proteólisis entre las hélices 2 y 3. Estas últimas, corresponden al un segmento desordenado desordenado, cuyos aminoácidos presentan principalmente una carga negativa. Así mismo, se ha observado de manera experimental que este segmento tiene la menor afinidad a lípido en comparación al resto de la proteína (Figs. 2b y 2c). En todos los casos, las fibras amiloides derivadas de ApoA-I son generadas a partir de péptidos correspondientes a los primeros 83R-94K aminoácidos del segmento N-terminal. Las mutaciones de los aminoácidos 26G, 50W y 60L también generan un cambio en la carga, una característica que favorece la formación de una conformación extendida de hoja- $\beta$ . Estos péptidos liberados presentan la misma carga neta, independientemente del origen de la mutación por lo que se observa una conservación en el perfil hidrofílico. Es importante resaltar que varios datos teóricos y experimentales relacionados con los dominios N y C-terminales de ApoA-I indican que ambos tienen una alta propensión para agregarse.



**Fig. 10.** El receptor ABCA1 promueve la transferencia de fosfolípidos a la forma pobre de lípido de la ApoA-I nativa, el principal componente de las HDLs. Probablemente ABCA1 transloca fosfolípidos y colesterol de la membrana plasmática a la ApoA-I generando la partícula HDL discoidal. Esta partícula discoidal es transformada en HDL esférica en la sangre por la acción de la enzima LCAT. La HDL esférica se asocia con el receptor SRB1 en la membrana plasmática de hepatocitos y transfiere colesterol libre y esterificado al hígado para su excreción en la bilis como colesterol libre (vía ABCG5/G8) o una subsecuente conversión en sales biliares [9]. En el caso de las isoformas amiloidogénicas de la ApoA-I, una adecuada interacción con ABCA1 es impedida y por tanto el proceso para la formación de la partícula HDL discoidal no es eficiente. Un tamaño no adecuado de la partícula discoidal impide la interacción con la enzima LCAT así como con el receptor SRB1. Esta partícula discoidal de tamaño anormal rápidamente es catabolizada, liberando diferentes péptidos con la capacidad de generar fibras amiloides.

Sin embargo, solo péptidos del N-terminal se encuentran en placas amiloidogénicas aisladas de personas afectadas por amiloidosis familiar o Alzheimer. Los segmentos de la ApoA-I con una tendencia a mantenerse en un estado desordenado, junto con su baja afinidad a lípido podría ser la clave para entender la formación de las partículas de HDL.

### **Conclusiones**

Actualmente el entender los mecanismos por los cuales las proteínas mutadas o nativas así como segmentos derivados de estas generan estructuras amiloides, ha resultado ser todo un desafío. En las proteínas varias transiciones del tipo desorden-orden han resultado ser reversibles por lo que este fenómeno se ha asociado frecuentemente con importantes eventos de señalización en la célula. Así mismo, debido a la posición clave de este fenómeno en la biología celular, el plegamiento anómalo de proteínas y transiciones conformacionales aberrantes se han asociado actualmente con un gran número de enfermedades. Sin embargo, en las proteínas las diferentes transiciones estructurales de tipo funcional o patológico podrían dar origen a amiloidosis, lo cual indica que tal vez simplemente la modulación de las rutas metabólicas involucradas a lo largo de la síntesis y de su microambiente es lo que regulan su destino amiloide o no.

### **Perspectivas**

Como una continuación de este trabajo se plantea estudiar de forma experimental las transiciones desorden-orden en nuestro modelo que es la ApoA-I, mediante mutaciones y en un medio mimético a la HDL que son las HDL reconstituidas (HDLr).

Con este sistema se evaluarán los cambios conformacionales del complejo ApoA-I/HDLr durante la interacción con receptores como ABCA1.

### Referencias

1. Barre DE, Guerra R, Verstraete R, Wang Z, Grundy SM and Cohen JC (1994) Genetic analysis of a polymorphism in the human apolipoprotein A-I gene promoter: effect on plasma HDL-cholesterol levels, *J. Lipid. Res.* 35 (1994)1292-6.
2. Brinton EA. Oral estrogen replacement therapy in postmenopausal women selectively raises levels and production rates of lipoprotein A-I and lowers hepatic lipase activity without lowering the fractional catabolic rate, *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* 16 (1996) 431-40.
3. Brouillette CG, Anantharamaiah GM, Engler JA and Borhani DW. Structural models of Human apolipoprotein A-I: a critical analysis and review, *Biochim. Biophys. Acta* 1531 (2001) 4-46.
4. Segrest JP, Li L, Anantharamaiah GM, Harvey SC, Liadaki KN, Zannis V. Structure and function of apolipoprotein A-I and high-density lipoprotein, *Curr. Opin. Lipidol.* 11 (2000) 105-15.
5. Ajees AA, Anantharamaiah GM, Mishra VK, Hussain MM, Murthy HM. (2006) Crystal structure of human apolipoprotein A-I: insights into its protective effect against cardiovascular diseases, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 103 (2006) 2126-31.
6. Okon M, Frank PG, Marcel YL, Cushley RJ. Secondary structure of human apolipoprotein A-I(1-186) in lipid-mimetic solution, *FEBS Lett.* 487 (2001) 390-6.
7. Steyrer E, Kostner GM. Activation of lecithin-cholesterol acyltransferase by apolipoprotein D: comparison of proteoliposomes containing apolipoprotein D, A-I or C-I, *Biochim. Biophys. Acta* 958 (1988) 484-91.
8. Rothblat GH, Mahlberg FH, Johnson WJ, Phillips MC. Apolipoproteins, membrane cholesterol domains, and the regulation of cholesterol efflux, *J. Lipid. Res.* 33 (1992) 1091-7.
9. Oram JF. ATP-binding cassette transporter A1 and cholesterol trafficking, *Curr. Opin. Lipidol.* 13 (2002) 373-81.
10. Fang Y, Gursky O, Atkinson D. Lipid-binding studies of human apolipoprotein A-I and its terminally truncated mutants, *Biochemistry* 42 (2003)13260-8.
11. Garda HA. Structure–function relationships in human apolipoprotein A-I: role of a central helix pair, *Future Lipidol.* 2 (2007) 95-104.
12. Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein, *J. Mol. Biol.* 157 (1982) 105-32.
13. Callebaut I, Labesse G, Durand P, Poupon A, Canard L, *et al.* Deciphering protein sequence information through hydrophobic cluster analysis (HCA): current status and perspectives, *Cell. Mol. Life Sci.* 53 (1997) 621-45.
14. Lagerstedt JO, Budamagunta MS, Oda MN and Voss JC (2007) Electron paramagnetic resonance spectroscopy of site-directed spin labels reveals the structural heterogeneity in the N-terminal domain of apoA-I in solution, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 9143-9.
15. Oda MN, Forte TM, Ryan RO, Voss JC. The C-terminal domain of apolipoprotein A-I contains a lipid-sensitive conformational trigger, *Nat. Struct. Biol.* 10 (2003) 455-60.
16. Uversky VN, Gillespie JR and Fink AL. Why are "natively unfolded" proteins unstructured under physiologic conditions? *Proteins* 41 (2000) 415-27.
17. Kono M, Okumura Y, Tanaka M, Nguyen D, Dhanasekaran P, Lund-Katz S, Phillips MC, Saito H. Conformational flexibility of the N-terminal domain of apolipoprotein a-I bound to spherical lipid particles, *Biochemistry* 47 (2008) 11340-7.
18. 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.* 517 (2002) 139-43.
19. Wang G, Treleaven WD, Cushley RJ. Conformation of human serum apolipoprotein A-I(166-185) in the presence of sodium dodecyl sulfate or dodecylphosphocholine by <sup>1</sup>H-NMR and CD. Evidence for specific peptide-SDS interactions, *Biochim. Biophys. Acta* 1301 (1996)174-84.
20. Wang G, Sparrow JT, Cushley RJ. The helix-hinge-helix structural motif in human apolipoprotein A-I determined by NMR spectroscopy, *Biochemistry* 36 (1997) 13657-66.
21. Wu Z, Wagner MA, Zheng L, Parks JS, Shy JM III, *et al.* The refined structure of nascent HDL reveals a key functional domain for particle maturation and dysfunction, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14 (2007) 861-8.

22. Schmidt HH, Haas RE, Remaley A, Genschel J, Strassburg CP, Buttner C, Manns MP. In vivo kinetics as a sensitive method for testing physiologically intact human recombinant apolipoprotein A-I: comparison of three different expression systems, *Clin. Chim. Acta* 268 (1997) 41-60.
23. Tartaglia GG, Pawar AP, Campioni S, Dobson CM, Chiti F, Vendruscolo M. Prediction of aggregation-prone regions in structured proteins, *J. Mol. Biol.* 380 (2008) 425-36.
24. Lashuel HA, Lansbury PT Jr. Are amyloid diseases caused by protein aggregates that mimic bacterial pore-forming toxins? *Q. Rev. Biophys.* 39 (2006)167-201.



**Efecto del microambiente en la  
conformación de péptidos  
derivados de ApoA-I**

Tomado de:

*Mol. Cell. Biochem.* (2014) 393, 99-109

### Resumen

En este trabajo se estudiaron péptidos derivados de los dominios N y C-terminal de la ApoA-I [DRV<sup>(9-24)</sup>], [KLL<sup>(45-63)</sup>] y [VLES<sup>(221-239)</sup>], los cuales contienen los segmentos más hidrofóbicos y no presentan una estructura definida en esta proteína. Mediante mediciones de DC en diferentes condiciones se demostró que ambientes lipídicos promueven sensiblemente estructuras hélice- $\alpha$  en estos péptidos. Las observaciones con MFA de muestras acuosas de los péptidos DRV<sup>(9-24)</sup> y VLES<sup>(221-239)</sup> mostraron estructuras amiloides similares a las encontradas en placas de pacientes con Alzheimer. Cuando los péptidos en estudio fueron incubados bajo condiciones que promueven la formación de estructuras globulares estables, VLES<sup>(221-239)</sup> presentó una mayor citotoxicidad en células de microglia y macrófago de ratón. Nuestros resultados proveen información valiosa para explicar diferentes propiedades fisicoquímicas de segmentos clave en la ApoA-I los cuales podrían estar implicados en transiciones desorden-orden que mantienen el delicado equilibrio entre las conformaciones nativa y anormal.

### Introducción

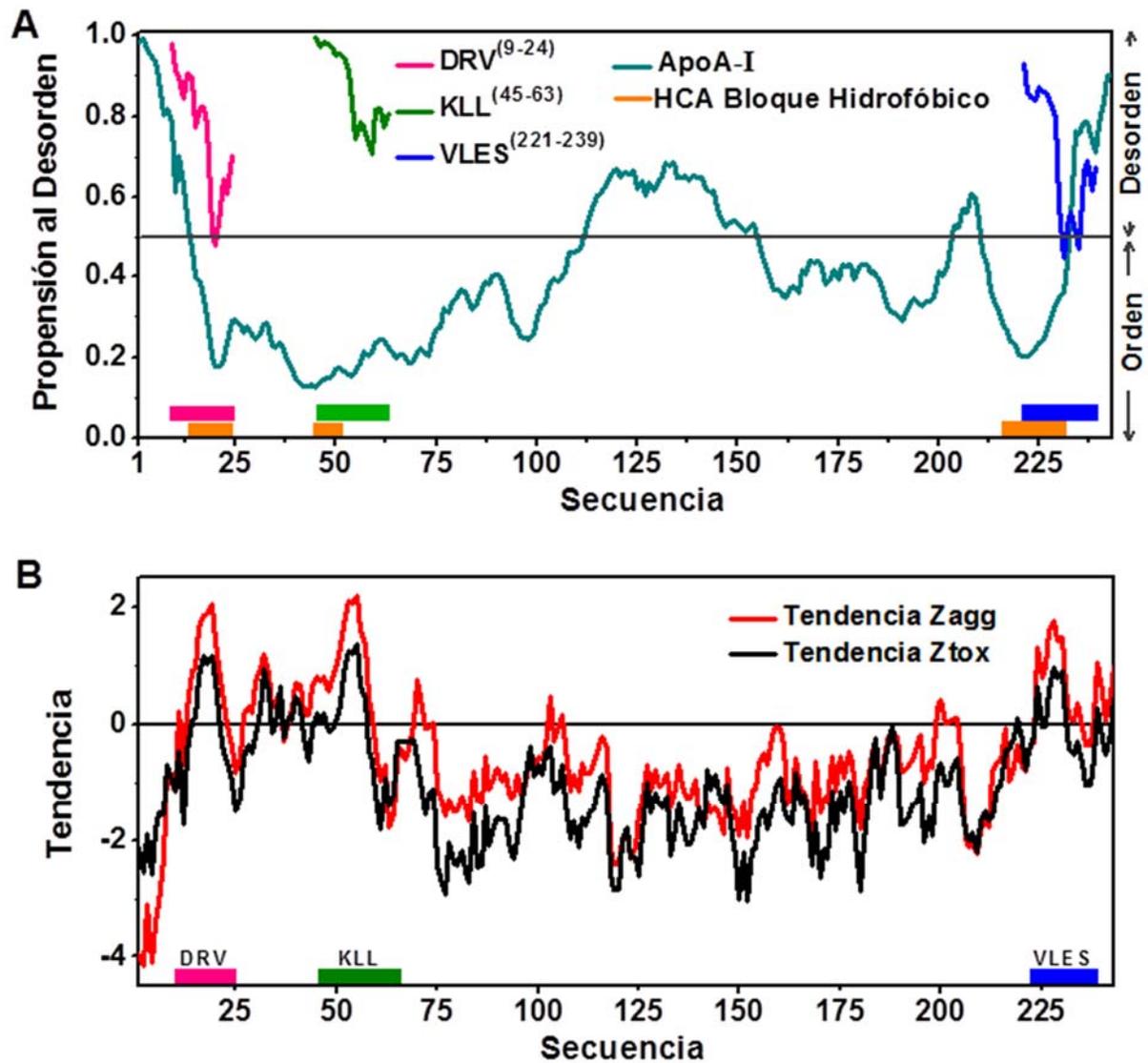
La apolipoproteína A-I representa un componente clave en el transporte reverso de colesterol y por esta razón los péptidos derivados de esta proteína son considerados como agentes terapéuticos potenciales contra enfermedades cardiovasculares [1]. Por otro lado, la ApoA-I en años recientes se ha convertido en blanco de múltiples estudios experimentales y teóricos [2]. Los dominios sin una estructura definida presentes en ésta y otras proteínas se han asociado a una capacidad para desarrollar

varias funciones [3]. Sin embargo, como se mencionó en la introducción estos segmentos presentan un factor potencial para el desarrollo de enfermedad [4]. Mediante diversos estudios se ha propuesto que los dominios funcionales en ApoA-I corresponden al N y C-terminales [5,6]. Con este estudio nosotros identificamos módulos hidrofóbicos dentro de la secuencia de esta proteína que promueven el autoensamble y la agregación. Así mismo identificamos que determinada posición de residuos aromáticos en una posición determinada en la secuencia proteica puede ser clave en la interacción con lípidos. Nuestros resultados proporcionan información importante sobre los mecanismos que regulan las transiciones conformacionales localizadas que podrían afectar la interacción de ApoA-I con las partículas HDL.

## **Resultados**

### **Análisis *in silico* de la proteína y péptidos derivados de ApoA-I**

Se utilizó el meta servidor PONDR-FIT y se encontraron cuatro regiones propensas al desorden (aminoácidos 1D-13D, 112M-154A, 204S-210A, 233L-243Q) en la secuencia de la proteína. Usando el servidor HCA (del inglés *Hydrophobic Cluster Analysis*) encontramos que son tres los segmentos con la hidrofobicidad más alta (aminoácidos 13D-22L, 45K-49N, 216Q-232A) y que corresponden a la secuencia de los péptidos DRV<sup>(9-24)</sup>, KLL<sup>(45-63)</sup> y VLES<sup>(221-239)</sup> (Fig. 1A). Así mismo, el algoritmo



**Fig. 1.** Predicción de sitios propensos a la agregación y desorden en la proteína ApoA-I. A) Los perfiles de desorden fueron creados con PONDR-FIT y los segmentos hélice- $\alpha$  altamente hidrofóbicos se predijeron usando el servidor HCA. B) El perfil de agregación ApoA-I se obtuvo utilizando el servidor Zyggregator, para determinar la propensión a generar estructuras globulares (Ztox Propensity) y fibras amiloides (Zagg Propensity).

Zyggregator identificó varios sitios con propensión para formar fibras amiloides y estructuras globulares (aminoácidos 15A-20D, 50W-57F y 224S-230L), los cuales también corresponden a la secuencia de los péptidos en estudio (Fig.1B). La predicción teórica para las velocidades de agregación (Zag propensity) indican que el péptido VLES<sup>(221-239)</sup> podría formar agregados tipo amiloide más rápido que los otros péptidos probados (Tabla 1).

**Tabla 1.** Propiedades fisicoquímicas de los péptidos DRV<sup>(9-24)</sup>, KLL<sup>(45-63)</sup> y VLES<sup>(221-239)</sup>

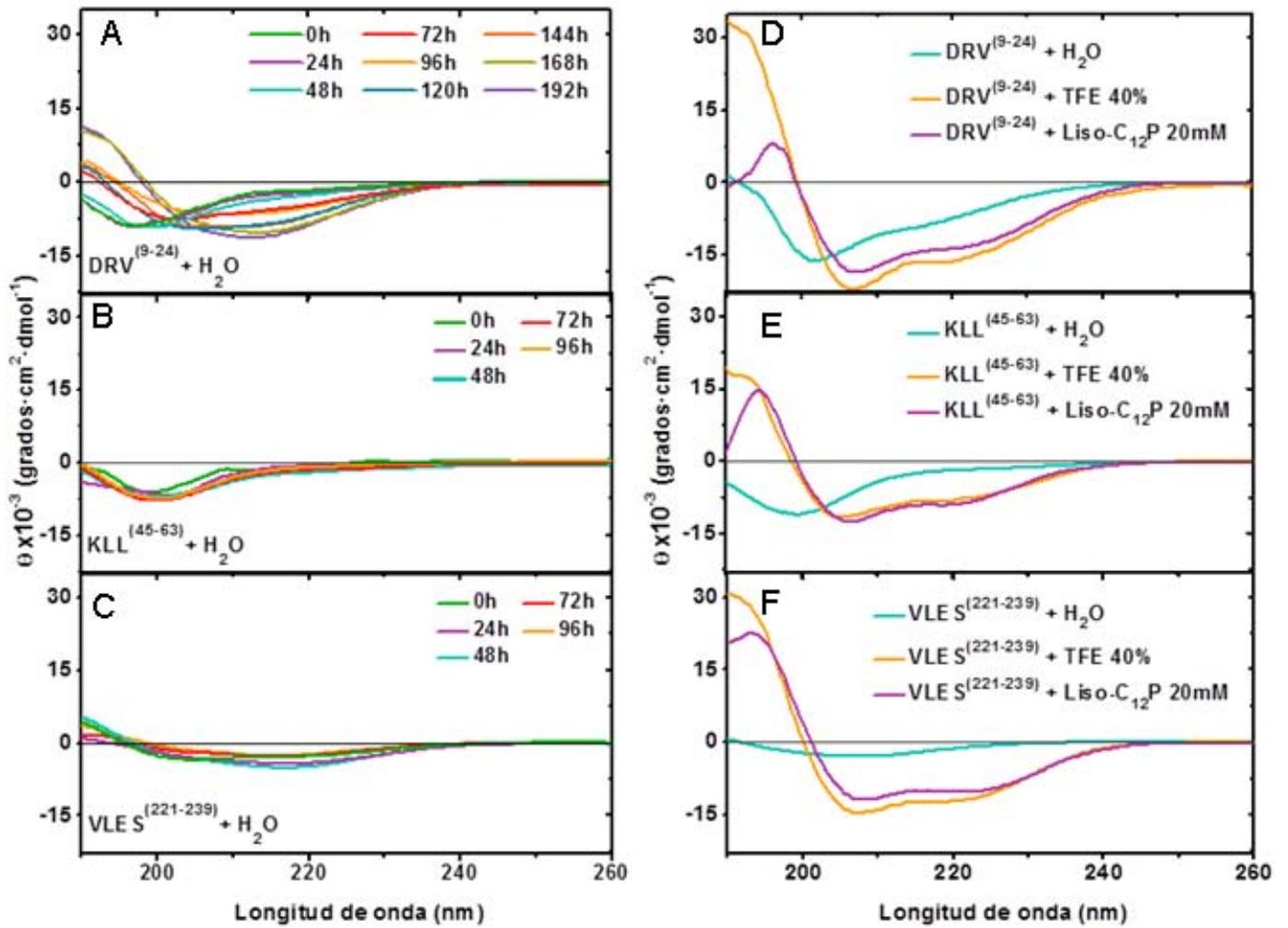
Péptido	DRV (9-24)	KLL (45-63)	VLES (221-239)
Secuencia de aminoácido <sup>a</sup>	DRVKDLATVYVDVLKD	KLLDNWDSVTSTFSKLRQ	VLESFKVVSFLSALLEEYTKK
Carga promedio	-1	0	0
Hidrofobicidad Promedio (kcal/mol)	-0.116	-0.151	0.118
Momento Hidrofóbico $\mu$ H (kcal/mol)	0.490	0.280	0.390
Hidrofobicidad del <i>Steric zipper</i> <sup>b</sup> (kcal/mol)	0.675	0.218	0.664
Tendencia de agregación Zag log K(s <sup>-1</sup> )	-4.3	-4.5	-3.2
Aminoácido aromático (X) y polar positivo (P)	• P • P • • • • X • • • • P •	• P • • • • X • • • • X • P • P • •	• • • • X P • • X • • • • X • P P
Formación de estructura globular	sí	sí	sí
Formación de fibrillas	sí	no	sí
Citotoxicidad	media	pobre	alta

<sup>a</sup> amino ácidos: positivo ●, negativo ●, polar sin carga ●, aromático ●

<sup>b</sup> El “*steric zipper*” está subrayado.

### Mediciones de Dicroísmo Celular

Se realizaron mediciones de DC en el UV lejano para los péptidos DRV<sup>(9-24)</sup>, KLL<sup>(45-63)</sup> y VLES<sup>(221-239)</sup> en solución acuosa con intervalos de 24 h (Fig. 2A-C), en presencia de 20 mM de Liso-C<sub>12</sub>PC (cmc=0.9 mM) o 40% TFE (Fig. 2 D-F). El espectro de DC de péptidos disueltos en agua presentaron un simple mínimo alrededor de 200 nm en el tiempo 0 h, lo que indica la presencia principalmente de estructuras desordenadas. En la presencia de Liso-C<sub>12</sub>PC y TFE los tres péptidos mostraron un claro mínimo a 208 nm y 222 nm, así como un máximo a 195 nm, característico de una hélice- $\alpha$  (Fig. 2D-F). La deconvolución de los espectros de DC para los péptidos DRV<sup>(9-24)</sup>, KLL<sup>(45-63)</sup> y VLES<sup>(221-239)</sup> en agua desplegaron una mezcla de estructuras hélice- $\alpha$ , hoja- $\beta$  y desordenada (Tabla 2). En esta tabla solo se muestran los porcentajes de las tres principales estructuras analizadas en este trabajo que son hélice- $\alpha$ ,  $\beta$  y sin estructura definida (rc, del inglés *random coil*). El resto de los porcentajes corresponden a vueltas tipo beta (en inglés *Beta-turn*) y estructuras paralelas.



**Fig. 2.** Espectros de DC en el UV -lejano de los péptidos derivados de ApoA-I. A-C) Espectro de los péptidos DRV<sup>(9-24)</sup>, KLL<sup>(45-63)</sup>, VLES<sup>(221-239)</sup> incubados por diferentes periodos en agua. D-F) Espectro de DC de los péptidos DRV<sup>(9-24)</sup>, KLL<sup>(45-63)</sup> y VLES<sup>(221-239)</sup> incubado por 24 h en 40% de TFE y 20 mM de Liso-C<sub>12</sub>PC.

**Tabla 2.** Contenido de estructura secundaria de péptidos derivados de ApoA-I en agua o moléculas de carácter anfipático.

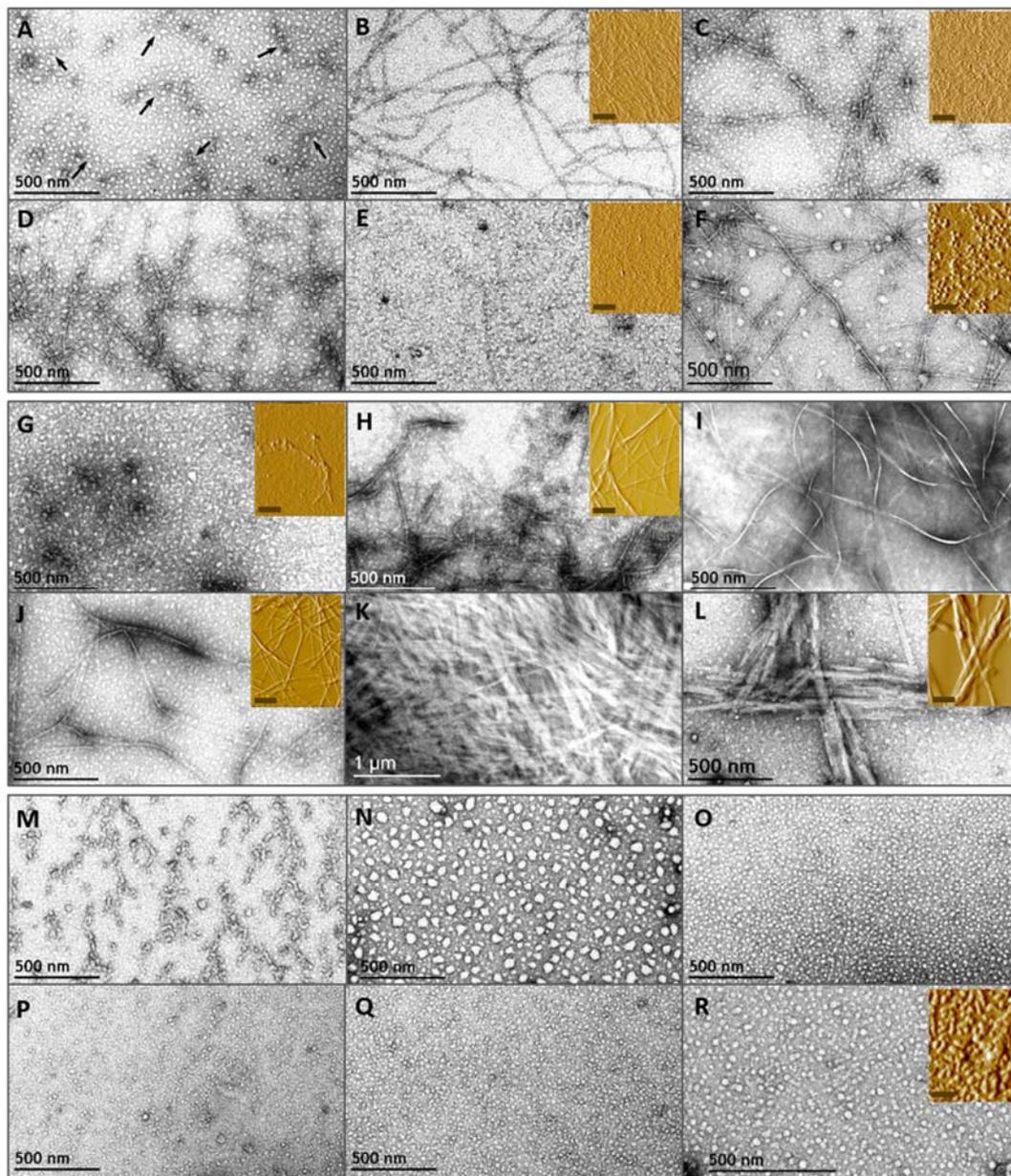
Muestra	Tiempo Incubación (horas)	PÉPTIDOS								
		DRV <sup>(9-24)</sup>			KLL <sup>(45-63)</sup>			VLES <sup>(221-239)</sup>		
		% $\alpha$	% $\beta$	% rc	% $\alpha$	% $\beta$	% rc	% $\alpha$	% $\beta$	% rc
H <sub>2</sub> O	0	6.6	35.3	38.4	4.5	38.2	35.4	8.5	46.0	28.6
	24	7.0	34.1	38.2	5.0	36.9	35.3	10.5	47.8	27.0
	48	7.3	32.3	38.4	5.1	36.4	35.2	11.1	45.2	27.7
	72	9.7	27.7	37.2	4.2	39.5	35.2	10.3	50.2	26.2
	96	11.2	26.9	36.4	4.0	41.2	35.2	10.3	46.0	27.6
	120	12.7	22.0	36.8						
	144	13.1	22.0	36.5						
	168	16.8	19.8	34.7						
	192	17.6	18.4	34.5						
TFE 40%	24	47.2	0.6	26.7	26.3	19.4	28.0	39.5	2.7	25.0
Liso-C <sub>12</sub> PC 20 mM	24	26.8	3.9	46.3	24.2	13.4	28.0	34.0	5.9	26.0

$\alpha$ : estructura hélice- $\alpha$ ,  $\beta$ : estructura beta, rc: sin estructura definida

### Péptidos agregados observados por MET y MFA

Debido al incremento en estructuras hoja- $\beta$ , se exploró la posible formación de fibras tipo amiloide. Las muestras de péptido se analizaron por MET (Fig.3) y MFA (Fig. 3, insertos). Esta figura muestra las diferentes conformaciones que los péptidos VLES<sup>(221-239)</sup> (Fig. 3A-F), DRV<sup>(9-24)</sup> (Fig. 3G-L) y KLL<sup>(45-63)</sup> (Fig. 3M-R) adquieren durante el tiempo de experimentación. El péptido VLES<sup>(221-239)</sup> al tiempo 0 h reveló estructuras protofibrilares (Fig. 3A, flechas) las cuales crecen de forma longitudinal a las 24 h de incubación (Fig. 3B). Se observa una modificación importante hasta los 120 días de incubación donde se forman estructuras globulares que incrementan su

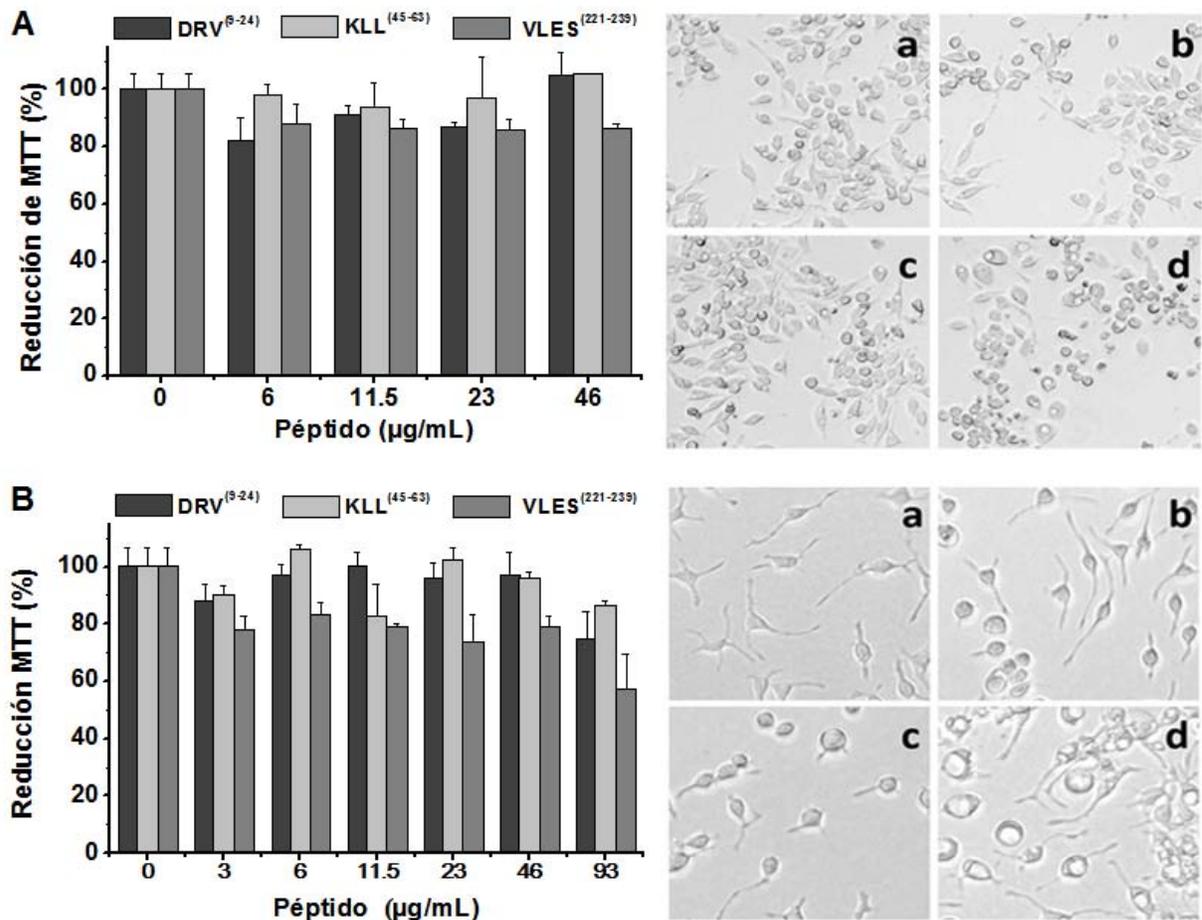
tamaño significativamente (Fig. 3F). El péptido DRV<sup>(9-24)</sup> desplegó una mezcla de oligómeros e intermediarios protofibrilares al inicio del experimento (Fig. 3G) y a las 24 horas de incubación observamos largas estructuras fibrilares (Fig. 3H). Las estructuras fibrilares generadas por este péptido aumentaron de tamaño paulatinamente hasta los 120 días de incubación (Fig. 3L). En contraste, agregados de tipo no fibrilar se observaron durante la incubación de KLL<sup>(45-63)</sup> (Fig. 3M-R).



**Fig. 3.** Microfotografías de MET y MFA de los péptidos DRV<sup>(9-24)</sup>, KLL<sup>(45-63)</sup> y VLES<sup>(221-239)</sup>. Estudio de los agregados en agua con microscopía electrónica y de fuerza atómica de los péptidos VLES<sup>(221-239)</sup> (A-F), DRV<sup>(9-24)</sup> (G-L) y KLL<sup>(45-63)</sup> (M-R). Los tiempos de incubación de los péptidos son: 0h (A, G, M), 24h (B, H, N), 48h (C, I, O), 72h (D, J, P), 92h (E, K, Q) y 120 días (F, L, R). Las flechas en A muestran las estructuras protofibrilares. Los insertos son imágenes de MFA de las muestras estudiadas por DC.

## **Ensayo de viabilidad celular y microscopía óptica**

Los efectos citotóxicos de los agregados formados por los péptidos DRV<sup>(9-24)</sup>, KLL<sup>(45-63)</sup> y VLES<sup>(221-239)</sup> fueron evaluados en células de macrófago y microglia de ratón [7], siguiendo la reducción de MTT como un indicador indirecto de estrés oxidativo celular. Los péptidos DRV<sup>(9-24)</sup>, KLL<sup>(45-63)</sup> y VLES<sup>(221-239)</sup> fueron incubados durante 120 días previos a la prueba de viabilidad. Cuando los macrófagos se expusieron a concentraciones incrementadas de los tres péptidos en estudio, la viabilidad celular decreció ligeramente en el caso de VLES<sup>(221-239)</sup>, sin mostrar una dependencia de la concentración de péptido (Fig. 4A). Para los experimentos de viabilidad realizados con células de microglia, se amplió el rango de concentración a 93 µg/mL. En estos ensayos se observó un descenso de viabilidad más claro (Fig. 4B). Las imágenes de microscopía óptica mostraron en las figuras 4Ad y 4Bd cambios morfológicos muy claros en ambos tipos de células tratadas con el péptido VLES<sup>(221-239)</sup>. En esta serie de experimentos de viabilidad celular en correlación a los agregados observados por MET y MFA, se observa claramente que las estructuras protofibrilares y oligómeros del péptido VLES<sup>(221-239)</sup> corresponden a la forma más citotóxica del péptido.



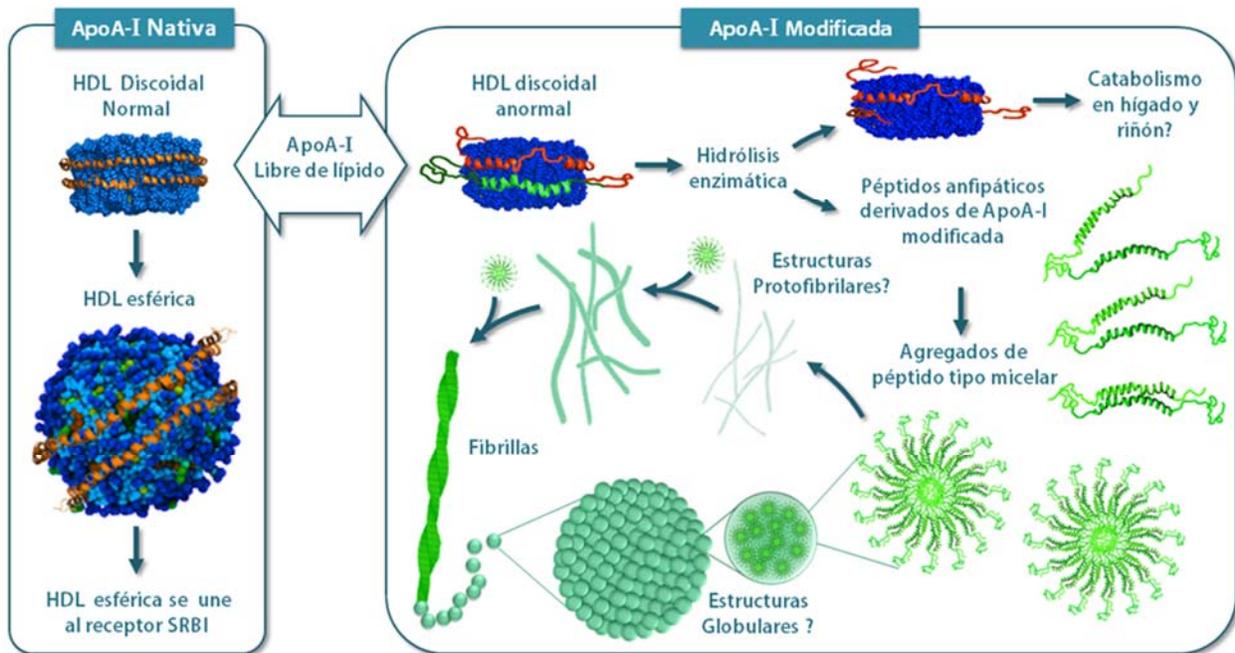
**Fig. 4.** Efectos citotóxicos de péptidos derivados de ApoA-I. A) Células de macrófago y B) Células de microglía. Los porcentajes de reducción de MTT corresponden al porcentaje de viabilidad. Las imágenes de microscopía óptica en (Aa-d) muestran células de macrófago tratadas con péptidos a 46 µg/mL y (Ba-d) corresponde a células de microglía tratadas con péptidos a 93 µg/mL. Los péptidos se probaron de la siguiente manera a) control, b) DRV<sup>(9-24)</sup>, c) KLL<sup>(45-63)</sup> y d) VLES<sup>(221-239)</sup>, estos péptidos se incubaron previamente a 4°C durante 120 días.

## Discusión

Cuando las apolipoproteínas son expuestas a interfases aire/agua y lípido/agua, una evidente transición conformacional desorden-orden toma lugar lo cual podría tener un impacto importante para la función de la HDL [8]. En este sentido, nosotros previamente mostramos que transiciones conformacionales observadas con una serie de péptidos derivados de la ApoA-I estabilizan y mejoran la actividad enzimática de LCAT [9]. En función de predecir cuales segmentos de ApoA-I podrían presentar la mayor propensión para generar transiciones desorden-orden, se usó el servidor PONDR-FIT con el cual encontramos tres segmentos que se unen a lípidos y adquieren una conformación helicoidal que podrían contribuir a la estabilización de la interacción lípido-proteína. En nuestro análisis también utilizamos el servidor HCA y observamos nuevamente tres segmentos altamente hidrofóbicos dentro de la estructura helicoidal de la ApoA-I.

Los péptidos y proteínas capaces de generar fibras amiloides presentan en común bloques de aminoácidos hidrofóbicos llamados “*steric zipper*” [10]. Interesantemente, el péptido DRV<sup>(9-24)</sup> presenta el valor de  $\mu\text{H}$  e hidrofobicidad promedio del “*steric zipper*” más alto seguido por el péptido VLES<sup>(221-239)</sup>. Esto nos permitió concluir sobre la importancia de un segmento que funge como centro de nucleación adecuado para la generación de estructuras fibrilares. Aunado a lo anterior, se observó en la deconvolución del espectro de DC para los péptidos DRV<sup>(9-24)</sup> y VLES<sup>(221-239)</sup> un moderado incremento en el contenido de hélice- $\alpha$ , a pesar de que las microfotografías mostraron la formación de fibrillas (Tabla 2). Esto sugiere que la estructura hélice- $\alpha$  podría tener un papel importante en la formación de este tipo de agregados, ya que se ha observado que pueden funcionar como un mecanismo para reclutar proteína

formando micelas de péptido, lo cual otorga de un cierto ordenamiento previo a la generación de la fibra. Por otro lado, el uso del servidor Zyggregator predijo que la propensión para la formación de fibras amiloides fue similar para los péptidos DRV<sup>(9-24)</sup>, KLL<sup>(45-63)</sup> y VLES<sup>(221-239)</sup> (Fig. 2B). Nosotros encontramos tres características elementales en los péptidos DRV<sup>(9-24)</sup> y VLES<sup>(221-239)</sup> que conducen a la agregación de proteínas. En primer lugar, los péptidos presentan un “*steric zipper*” característico de las proteínas amiloides (Tabla 1). Segundo, la presencia de aminoácidos aromáticos, en particular la fenilalanina, está relacionada con el auto-ensamble de fibras amiloides. Finalmente, observamos una uniformidad en los aminoácidos que componen el “*steric zipper*” y las regiones adyacentes, una propiedad relacionada a interacciones proteína-proteína que dirigen la formación de fibras tipo amiloide. La existencia de segmentos desestructurados en los dominios N y C-terminal de ApoA-I hacen a la proteína susceptible a hidrólisis enzimática [11], fenómeno que incrementa la probabilidad para la generación de estructuras autoinmunes altamente hidrofóbicas que en turno podrían inducir una respuesta inflamatoria [12], promoviendo la generación de centros de nucleación importantes en la formación de fibras tipo amiloide (Fig. 5) [8]. Durante nuestro ensayo de viabilidad, el péptido VLES<sup>(221-239)</sup> y en una menor extensión el péptido DRV<sup>(9-24)</sup>, los dos péptidos que generan fibras, tienen la habilidad de promover citotoxicidad. El péptido VLES<sup>(221-239)</sup> además presenta la propiedad de alterar la membrana celular como se observó por microscopía óptica (Fig. 4Bd), lo cual podría estar asociado a la formación de estructuras hélice- $\alpha$  en presencia de lípidos. Se ha observado que la estructura helicoidal en péptidos permite la formación de canales de tipo amiloide o inclusive se genera un efecto tipo detergente en las membranas.



**Fig. 5.** Propiedades de agregación de ApoA-I. ApoA-I pobre de lípido interactúa con el receptor ABCA1 y producen estructuras discoidales siguiendo un proceso hasta el momento no definido. Las partículas discoidales son transformadas en HDLs esféricas por la acción de la enzima LCAT. Solamente las formas esféricas de HDL pueden interactuar con el receptor SRB1. La ApoA-I modificada no puede interactuar propiamente con el receptor ABCA1 formando HDLs discoidales anormales. Una consecuencia de esta condición es la exposición de segmentos altamente desestructurados de ApoA-I propensos a la hidrólisis enzimática. Los péptidos liberados podrían generar estructuras amiloidogénicas que se organizan en estructuras tipo micela y posteriormente evolucionan a estructuras protofibrilares dependiendo de la composición de los residuos. Modificado de Mendoza-Espinosa P, *et al.* 2011 [13].

Mediante las microfotografías de TEM y MFA de las muestras del péptido VLES<sup>(221-239)</sup> es posible concluir que los protofilamentos, así como las estructuras globulares corresponden a las estructuras citotóxicas de este péptido. Basados en las

transiciones conformacionales y la citotoxicidad asociada a la ApoA-I derivada de los péptidos utilizados en este trabajo, nosotros sugerimos que las transiciones desorden-orden que permiten la formación de una estructura hélice- $\alpha$  en esta proteína en una interface hidrofílico/hidrofóbica de membranas, puede ser considerada una característica clave para explicar la citotoxicidad celular.

Nuestros estudios ponen en perspectiva el hecho de que segmentos altamente hidrofóbicos de la ApoA-I presentan la habilidad de desarrollar transiciones desorden-orden de estructura secundaria dependiendo de las moléculas a las cuales se asocia. La asociación de estos segmentos altamente hidrofóbicos a tipos de moléculas específicos podría cambiar el equilibrio hacia la consolidación de segmentos helicoidales de tipo hélice- $\alpha$  que podrían aparentemente garantizar la función normal de la proteína. En contraste, si estos segmentos realizan interacciones proteína-proteína o son puestos en ambientes altamente hidrofílicos, se propicia la posibilidad de generar estructuras pro-agregantes que podrían afectar la función normal de la ApoA-I.

### **Conclusiones**

La estructura dinámica que exhibe la ApoA-I básicamente soportada por segmentos expuestos intrínsecamente desordenados, experimentan transiciones conformacionales de tipo desorden-orden y orden-desorden que podrían explicar las propiedades intercambiables observadas en esta familia de apolipoproteínas. Cuando la proteína es localizada en un ambiente altamente hidrofílico con sus segmentos hidrofóbicos expuestos, adquiere una conformación desordenada y esto permite la

permanencia de la proteína en plasma. Sin embargo, cuando estos segmentos comienzan a asociarse a lípido, adquieren estructuras secundarias organizadas principalmente de tipo hélice- $\alpha$ , permitiendo la formación y consolidación de partículas lipídicas que darán origen a las HDL.

Durante muchos años, la función de la proteína se ha sustentado en estructuras bien ordenadas, tridimensionalmente rígidas y fueron fundamentales para el entendimiento de la función proteica. En este sentido, un número importante de enfermedades que en el pasado habían sido difíciles de entender, actualmente comienzan a encontrar una explicación en el plegamiento anómalo de proteínas [14]. Sin lugar a dudas, nosotros podemos decir que, en el futuro cercano muchas enfermedades con un pobre entendimiento en sus orígenes no solo encontrarán una explicación molecular basada en este fenómeno, sino también en la forma en la que regiones de proteínas intrínsecamente desordenadas son moduladas.

## **Perspectivas**

Este trabajo representa la culminación de todo un bloque de estudios realizados en el laboratorio, sin embargo el encontrar respuestas lleva consigo la generación de otras preguntas. En este sentido, la dirección del siguiente trabajo estará encaminado a estudiar las interacciones de ApoA-I con el receptor de membrana SRB1, lo cual sin lugar a dudas nos dará información relevante sobre el proceso del transporte reverso de colesterol.

## Materiales y Métodos

*Síntesis de péptido y preparación de las muestras:* Los péptidos fueron sintetizados basados en la secuencia reportada para la ApoA-I, y la función de L N- y C- terminal: D<sup>9</sup>-RVKDLATVYVDVLKD<sup>24</sup> [DRV9-24], K<sup>45</sup>-LLDNWDSVTSTFSKLREQ<sup>63</sup> [KLL45-63], y V<sup>221</sup>-LESFKVSFLSALEEYTKK<sup>239</sup> [VLES221-239]. La pureza de los péptidos fue mayor que 98% (GenScript Corp., Piscataway, NJ, USA). Los péptidos liofilizados fueron disueltos en agua ultrapura (18.2 MΩ·cm, pH 6.8) a 1 mg/ml y diluido para dar una concentración final del péptido de 200 µg/ml en solución acuosa o con las moléculas que van a ser probadas como el Lauril-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfolina (Liso-C<sub>12</sub>PC) y trifluoroetanol (TFE). La concentración de la proteína fue determinada por residuos aromáticos en una absorbancia a 280 nm.

*Espectroscopía de Dicroísmo Circular:* Los espectros de Dicroísmo Circular en el UV lejano se registraron en un espectropolarímetro Avid 62DS, utilizando una celda de cuarzo de 0.1 cm. Los parámetros utilizados para las mediciones fueron 2.5 s en el tiempo promedio y 0.5 nm en el tamaño de paso sobre un rango de longitud de onda de 190-260 nm. Los resultados de DC son reportados como elipticidad molar promedio ( $\Theta$ , deg cm<sup>2</sup> dmol<sup>-1</sup>), considerando una corrección de la línea base. El contenido de estructura secundaria fue calculado en un rango de longitud de onda de 190-260 nm, usando el algoritmo de redes neurales CDNN [14].

*Análisis in silico:* Se utilizó el algoritmo PONDR-FIT para predecir cambios conformacionales [15]. Los segmentos hidrofóbicos basados en la estructura secundaria de las cadenas polipeptídicas de la ApoA1 fueron predichas usando el

servidor HCA [16]. Las regiones propensas a formar estructuras amiloides y estructuras globulares en estas proteínas fueron realizadas con el servidor Zyggregator [17].

*Cinética de agregación del péptido:* Las soluciones del péptido en agua fueron incubadas a 4°C durante varios días. Las muestras de estos péptidos fueron tomadas a 0h, 24h, 48h, 72h, 96h y 120 días, posteriormente se observaron usando microscopía electrónica de transmisión y microscopía de fuerza atómica.

*Microscopía electrónica de transmisión (MET):* Las soluciones de los péptidos fueron depositadas en rejillas de carbón activado de MET y posteriormente teñidas con 2% de acetato de uranilo. Las estructuras teñidas con la tinción negativa fueron analizadas usando un equipo de TEM JEM-1200EX11 (JEOL, Japan).

*Microscopía de fuerza Atómica (MFA):* Unas alícuotas de solución de péptido en agua fueron depositadas en mica recién cortada y posteriormene fue secada bajo flujo laminar durante 5 minutos. Las imágenes fueron obtenidas usando un microscopio MultiMode (Digital Instruments, Ltd., Veeco Instruments, Watford, UK) en conjunto con el control del sistema Nano Scope IIIa (Digital Instruments Ltd., Veeco Instruments). Las imágenes fueron tomadas en modo contacto con tamaños de 5.0  $\mu\text{m}$  x 5.0  $\mu\text{m}$ , a una frecuencia de escaneo de 2 Hz, usando puntas de nitruro de silicio.

*Ensayo de toxicidad con MTT:* Se crecieron células RAW y EOC como se describe en Manzano-Leon *et al.* 2006. Las células de macrófago y microglia fueron

sembradas en placas de 96 pozos a una densidad de  $1 \times 10^4$  células/pozo (100  $\mu\text{L}$ /pozo) e incubadas por 24 h. Se realizaron diluciones seriales de péptidos previamente incubados (120 días a  $4^\circ\text{C}$  en agua ultrapura) utilizando medio reducido en suero Opti-MEM sin rojo de fenol. Posteriormente se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de estas diluciones en cada pozo con células. Las incubaciones se realizaron por 20 h y la viabilidad celular se estimó midiendo la reducción celular del Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT) [7]

*Microscopía Óptica:* Las imágenes de las células fueron capturadas, procesadas y convertidas a formato TIFF utilizando un microscopio Olympus IX71 (100 y 400x) y el software Image-Pro 3DS 6.0.

### Referencias

1. Barter PJ, Rye KA. Molecular mechanisms of reverse cholesterol transport, *Curr. Opin. Lipidol.* 7 (1996) 82-7.
2. Uversky VN, Gillespie JR, Fink AL. Why are "natively unfolded" proteins unstructured under physiologic conditions? *Proteins* 41 (2000) 415-27.
3. Tompa P. Intrinsically disordered proteins: a 10-year recap, *Trends Biochem. Sci.* 37 (2012) 509-16.
4. Mendoza-Espinosa P, Garcia-Gonzalez V, Moreno A, Castillo R, Mas-Oliva J. Disorder-to-order conformational transitions in protein structure and its relationship to disease, *Mol. Cell. Biochem.* 330 (2009) 105-20.
5. Kono M, Okumura Y, Tanaka M, Nguyen D, Dhanasekaran P, *et al.* Conformational flexibility of the N-terminal domain of apolipoprotein A-I bound to spherical lipid particles, *Biochemistry* 47 (2008) 11340-7.
6. 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.* 517 (2002) 139-43.
7. Garcia-Gonzalez V, Mas-Oliva J. Amyloidogenic Properties of a D/N Mutated 12 Amino Acid Fragment of the C-Terminal Domain of the Cholesteryl-Ester Transfer Protein (CETP), *Int. J. Mol. Sci.* 12 (2011) 2019-35.
8. Abe K, Saito H. Both oxidative stress-dependent and independent effects of amyloid beta protein are detected by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction assay, *Brain Res.* 830 (1999) 146-54.
9. Campos-Terán J, Mendoza-Espinosa P, Castillo R, Mas-Oliva J (2012) Conformational and Disorder to Order Transitions in Proteins: Structure / Function Correlation in Apolipoproteins. In: Weibo Cai and Hao Hong (Eds) Protein-Protein Interactions- Computational and Experimental Tools, Intech, Rijeka, Croatia pp. 331-358.
10. 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.* 517 (2002) 139-43.
11. Okon M, Frank PG, Marcel YL and Cushley RJ Secondary structure of human apolipoprotein A-I(1-186) in lipid-mimetic solution, *FEBS Lett.* 487 (2001) 390-6.

12. Wu Z, Wagner MA, Zheng L, Parks JS, Shy JM, 3rd, Smith JD, Gogonea V, Hazen SL. The refined structure of nascent HDL reveals a key functional domain for particle maturation and dysfunction, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14 (2007) 861-8.
13. Campos-Terán J, Mendoza-Espinosa P, Castillo R, Mas-Oliva J. Conformational and Disorder to Order Transitions in Proteins: Structure/Function Correlation in Apolipoproteins, (2012) In Protein Interaction/Book 2, In Tech – Open Acces Publisher.
14. Xue B, Dunbrack RL, Williams RW, Dunker AK, Uversky VN. PONDR-FIT: a meta-predictor of intrinsically disordered amino acids, *Biochim. Biophys. Acta* 1804 (2010) 996-1010.
15. Wu Z, Gogonea V, Lee X, Wagner MA, Li XM, *et al.* Double superhelix model of high density lipoprotein, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 36605-19.
16. Fang Y, Gursky O, Atkinson D Lipid-binding studies of human apolipoprotein A-I and its terminally truncated mutants, *Biochemistry* 42 (2003) 13260-8.
17. DuBay KF, Pawar AP, Chiti F, Zurdo J, Dobson CM, Vendruscolo M. Prediction of the absolute aggregation rates of amyloidogeni
18. c polypeptide chains, *J. Mol. Biol.* 341 (2004) 1317-26.



## Discusión y Perspectivas

Este estudio nos permitió comprender los mecanismos por los cuales las apolipoproteínas como la ApoA-I y la ApoC-I llevan a cabo su función dentro del importante proceso conocido como transporte reverso de colesterol. El estudio realizado a través de péptidos derivados de la secuencia de ApoC-I nos permitió identificar que la proteína completa podría tener la capacidad de modular cada dominio de manera independiente en función del microambiente en el que se encuentre inmersa. De esta manera puede permanecer parcialmente anclada a la partícula HDL por medio de un segmento con estructura hélice- $\alpha$ , mientras que el dominio expuesto al medio permanece desestructurado y disponible para interactuar con un receptor o una enzima. Así mismo, los experimentos con ApoC-I nos permitieron comprender que la presencia de lípidos específicos es capaz de modular la función de esta y otras proteínas. En el caso de la interacción de LCAT con la HDL se genera como subproducto a la esterificación del colesterol el lisofosfolípido Liso-C<sub>12</sub>PC. El Liso-C<sub>12</sub>PC es un inhibidor de la actividad de LCAT, lo cual podría estar relacionado con cambios de la estructura en su sitio activo o de ApoC-I que tiene la función de activar a esta enzima. En nuestros experimentos de DC observamos que los péptidos derivados de ApoC-I (ALDO<sup>(7-24)</sup>, ARELI<sup>(22-38)</sup> y SAK<sup>(35-53)</sup>) adquieren un alto porcentaje de estructura secundaria en presencia del Liso-C<sub>12</sub>PC, principalmente el péptido que corresponde al segmento C-terminal. En la literatura se ha reportado que el segmento C-terminal de ApoC-I podría ser el dominio que activa a la enzima LCAT y el adquirir una estructura secundaria rígida, en este caso de hélice- $\alpha$ , podría detener su función de activador. En nuestro estudio sobre péptidos derivados de ApoA-I y su efecto en la actividad de LCAT también observamos un efecto de Liso-C<sub>12</sub>PC como modulador en la actividad de la enzima. Se observó una actividad óptima de los péptidos DRV, KLL y VLES sobre

LCAT usando una concentración de péptido/Liso-C<sub>12</sub>PC de 0.9 mg/mL:30mM. En este caso consideramos que el Liso-C<sub>12</sub>PC funcionó como un estabilizador de una estructura soluble en los péptidos para que pudiera interactuar con la enzima LCAT.

La ApoA-I tiene la particularidad de estar conformada principalmente por hélices- $\alpha$  de tipo anfipática, además cada hélice presenta un parche altamente hidrofóbico. Esto favorece una mejor interacción con la monocapa de fosfolípidos que componen a la HDL, pero cuando esta cambia su estructura de discoidal a esférica presenta un cambio en la tensión interfacial. Una consecuencia es que la interacción ApoA-I/HDL se vea disminuida y a medida que queda más expuesta la ApoA-I en la superficie, ciertos dominios sensibles a la interacción con lípido pierden estructura. Esto último facilita el proceso de intercambio entre lipoproteínas que realiza la ApoA-I, dado que al perder la estructura de hélice- $\alpha$  la estructura desordenada presenta características de tipo hidrofílico. Así mismo, la presencia de segmentos desordenados permite la interacción con diferentes receptores y enzimas. Como es el caso de la interacción de ApoA-I con los receptores de membrana ABCA-1 o SRB1 y la enzima LCAT. Se postula que todas estas interacciones podrían ser llevadas a cabo por segmentos desestructurados como de ApoA-I como son el dominio N y C-terminal dada la alta plasticidad observada en la molécula completa y por nosotros en los péptidos derivados de estos segmentos. Los cambios estructurales denominados en este trabajo como transiciones desorden-orden y orden-desorden permiten modular cada una de las interacciones proteína-proteína y proteína-lípido, por lo que resulta para nosotros muy satisfactorio mencionar que en este trabajo encontramos detalles estructurales y fisicoquímicos que permiten explicar estas transiciones en la ApoA-I. El efecto de estas transiciones en la función de ApoA-

Se observaron de manera contundente en el estudio de la activación de la enzima LCAT por los péptidos DRV, KLL y VLES.

Un ejemplo más sobre las transiciones desorden-orden lo constituye CETP, esta proteína encargada del transporte de éster de colesterol y triglicéridos de la HDL a la LDL principalmente mediante un mecanismo que actualmente está bajo una profunda investigación por las grandes repercusiones que tiene en el campo clínico. Este proyecto corresponde a una línea que lleva varios años de estudio en el laboratorio y ha crecido al punto en el cual los resultados obtenidos han generado desarrollos tecnológicos. Los resultados obtenidos en el trabajo aquí presentado permitieron corroborar, mediante experimentos *in silico*, una propuesta del laboratorio, en donde el dominio C-terminal de CETP estaría realizando la transferencia de lípido mediante un proceso de micelización.

Nuestro interés no solo es sobre los mecanismos que regulan la función de las proteínas, que en este caso usamos como modelo principal a las apolipoproteínas, sino que abarca también aquellas situaciones en las cuales pierden su estructura nativa y generan alguna enfermedad. Nosotros abordamos principalmente la agregación, la cual es debida principalmente a la mutación o delección de ciertos segmentos en las apolipoproteínas y otras proteínas como Transteritina, P53 y Amilina. Con respecto a la ApoA-I, nuestros estudios nos permitieron observar cambios conformacionales o transiciones desorden-orden en un contexto fisiológico y de enfermedad. La ApoA-I debido a su alta hidrofobicidad también es altamente susceptible a agregarse y por tal razón se asocia a procesos amiloidogénicos. En este contexto realizamos estudios *in silico* con la secuencia nativa de ApoA-I y encontramos tres sitios clave que podrían ser centros de nucleación y agregación. Estos sitios de nucleación corresponden a los péptidos DRV<sup>(9-24)</sup>, KLL<sup>(45-63)</sup> y VLES<sup>(221-239)</sup> por lo que esta coincidencia refleja la

importancia entre la función y la interacción con lípido en ApoA-I. Nuestros hallazgos nos permitieron postular un mecanismo por el cual la proteína ApoA-I modificada (debido a una mutación o un agente altamente oxidante) entra en un proceso amiloidogénico. Inclusive, con base a múltiples observaciones de micrografías de TEM y de MFA propusimos una sucesión de pasos que ocurren hasta la formación de la fibra y su crecimiento mediante estructuras globulares, lo cual hasta el momento algunos todavía consideran que se debe únicamente a la adhesión de péptido libre en los extremos de las fibras.

Todos estos trabajos nos permitieron reconocer un punto común en los procesos que generan estructuras nativas o patológicas en las proteínas, que es la modulación de estas transiciones desorden-orden mediante el microambiente. A este respecto, en el laboratorio se abren nuevos caminos para estudiar innumerables aplicaciones de estas transiciones desorden-orden en proteínas involucradas en el transporte de lípidos. Actualmente existen evidencias que sugieren que las proteínas pueden desempeñar funciones importantes por medio de segmentos no estructurados. En este contexto, diversas enfermedades que en el pasado han presentado dificultades para entenderse actualmente podrían encontrar una explicación en el plegamiento anómalo de proteínas. Indudablemente, podemos decir que en el futuro cercano muchas enfermedades con un pobre entendimiento de sus orígenes no solo encontrarán una explicación a nivel molecular basados en este fenómeno, sino que además se entenderá cómo se modulan los segmentos intrínsecamente desordenados en las proteínas.

## Perspectivas

Para entender mejor los cambios de estructura desorden-orden de los péptidos estudiados en este trabajo se realizarán estudios de tipo termodinámico para conocer los cambios energéticos que se requieren para llevar a cabo estos procesos.

Se realizará un estudio de dinámica molecular con los péptidos mencionados en este trabajo para conocer a nivel atómico su interacción con lípido estructurado en micelas y en monocapa.

Estudiar mediante cultivos celulares la interacción de ApoA-I con su receptor SRB1, mediante péptidos derivados de esta apolipoproteína o utilizando la molécula completa.

Debido al potencial que presenta el péptido derivado del extremo C-terminal de ApoA-I (VLES<sup>(221-239)</sup>) para actuar como un agente antibacteriano, en futuros experimentos se propone probar este péptido con varios tipos de bacterias.

Realizar estudios *in vitro* con diferentes tipos de lípidos para encontrar cuales podrían ser útiles en la formación de HDL discoidales de un tamaño adecuado, utilizando una ApoA-I mutada o modificada y de esta forma puedan ser reconocidas por la enzima LCAT. Estudiar el efecto de las balsas lipídicas y del colesterol en los procesos de formación de placas amiloides en cultivos de macrófagos o microglia.

Generar mediante técnicas de librerías de péptidos las secuencias polipeptídicas que sean capaces de activar de forma más eficiente a la enzima LCAT.

Con respecto al mecanismo de CETP por el cual transporta lípidos, en un estudio futuro se realizarán dinámicas de “potencial de transporte de lípidos” a través de la estructura de esta proteína y medir el coste energético que produciría el paso de un fosfolípido, de esta forma se pretende confirmar que es más factible el proceso de micelización propuesto en el trabajo de García-González *et al.* realizado en el laboratorio.

## Lista de publicaciones

1. Paola Mendoza-Espinosa, Abel Moreno, Rolando Castillo, Jaime Mas-Oliva Lipid dependant disorder-to-order conformational transitions in apolipoprotein C-I derived peptides, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008, 365:8-15.
2. Paola Mendoza-Espinosa, Víctor García-González, Abel Moreno, Rolando Castillo, Jaime Mas-Oliva. Disorder-to-order conformational transitions in protein structure and its relationship to disease, *Mol. Cell. Biochem.* 2009, 330:105-120.
3. José Campos-Terán, Paola Mendoza-Espinosa, Rolando Castillo and Jaime Mas-Oliva Conformational and disorder to order transitions in proteins: Structure/function correlation in apolipoproteins, 2012. In Protein Interaction/Book 2, In Tech – Open Acces Publisher.
4. Pilar Brocos, Paola Mendoza-Espinosa, Rolando Castillo, Jaime Mas-Oliva, Ángel Piñeiro Multiscale molecular dynamics simulations of micelles: Coarse grain for self-assembly and atomic resolution for finer details, *Soft Matter.* 2012, 8:9005-9014.
5. Sandra Luz Aguilar-Espinosa, Paola Mendoza-Espinosa, Blanca Delgado-Coello, Jaime Mas-Oliva Lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) activity in the presence of Apo-AI-derived exposed to disorder-to-order conformational transitions, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2013, 441:469-475.
6. Víctor García-González, Nadia Gutiérrez-Quintanar, Paola Mendoza Espinosa, Pilar Brocos, Ángel Piñeiro, Jaime Mas-Oliva. Key structural arrangements at the C-terminus domain of CETP suggest a potential mechanism for lipid-transfer activity, *J. Struct. Biol.* 2014, 186:19-27.
7. Paola Mendoza-Espinosa, Danai Montalvan-Sorrososa, Victor García-González, Abel Moreno, Rolando Castillo, Jaime Mas-Oliva. Microenvironmentally controlled secondary structure motifs of apolipoprotein A-I derived peptides, *Mol. Cell. Biochem.* 393 (2014) 99-109.

## Lista de participación en congresos

### **2ª Reunión de la Red Temática del CONACYT de la Materia Condensada Blanda**

Ángel Piñeiro, Pilar Brocos, Paola Mendoza-Espinosa, Rolando Castillo, Jaime Mas-Oliva. Simulaciones de dinámica molecular multiescala de micelas: Grano-grueso para el autoensamble y resolución atómica para detalles finos. Guanajuato, Gto. México, 27- 31 Enero 2013.

### **2<sup>nd</sup> USA-Mexico Workshop in Biological Chemistry: Protein Folding, Misfolding and Design**

Paola Mendoza-Espinosa, Víctor García-González, Rolando Castillo, Abel Moreno, Jaime Mas-Oliva. Amyloidogenic peptides derived from native Apolipoprotein A-I (ApoA-I). México, D.F, Ciudad Universitaria, Marzo 18-21, 2011.

### **XXXIX Annual Meeting of the Argentinean Biophysical Society 2010 and 3rd Latin American Protein Society Meeting**

Paola Mendoza-Espinosa, Jaime Mas-Oliva. Binding to Human Scavenger Receptor Class B Type I of ApoA-I derived peptides showing different secondary structure conformations. Salta, Argentina, Octubre 12-16, 2010.

### **1<sup>ra</sup>. Feria Latinoamericana de Innovación e Invención en Salud**

Sandra Luz Aguilar-Espinosa, Paola Mendoza-Espinosa, Jaime Mas-Oliva. Péptidos activadores de LCAT con un potencial efecto ateroprotector en pacientes con bajos niveles de HDL-C. México, D.F, Ciudad Universitaria, Marzo 22-26, 2010.

### **USA-Mexico Workshop in Biological Chemistry: Multidisciplinary Approachs to Protein Folding**

Paola Mendoza-Espinosa, Jaime Mas-Oliva, Pilar Brocos, Ángel Piñeiro. Atomistic simulation of apoC-I in a lipoprotein-like environment. Cinvestav, Zacatenco, México, Marzo 25-27, 2009.

### **12<sup>th</sup> Internacional Conference on the Crystallization of Biological Macromolecules.**

Paola Mendoza-Espinosa, Abel Moreno, Rolando Castillo, Jaime Mas-Oliva. Amyloid-like fibril structures developed by apolipoprotein A-I derived peptides. Cancún, México. Mayo 6 – 9, 2008.

### **2<sup>nd</sup> Latin American Protein Society Meeting and 1st Congress of the Branch of Physical Chemistry, Structure and Protein Design of the Mexican Society of Biochemistry**

Paola Mendoza-Espinosa, Abel Moreno, Rolando Castillo, Jaime Mas-Oliva. Amyloid-like fibril structures developed by apolipoprotein A-I derived peptides. Acapulco, México. Noviembre 4-8, 2007.

### **Physical and Chemical Aspects of Molecular Biology, An International Workshop on Current Problems in Complex Fluids**

Paola Mendoza-Espinosa, Juan Pablo Reyes-Grajeda, Rolando Castillo, Abel Moreno, Jaime Mas-Oliva. Lipid dependent disorder-to-order conformational switches in apolipoproteins A-I and C-I derived peptides. Puebla, México. Enero 3-6, 2007.



# ANÉNDICE I

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

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

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

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

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

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

## Introduction

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

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

---

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

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

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

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

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

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

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

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

## Materials and methods

### Peptide synthesis and sample preparation

Three peptides were synthesized (purity > 98 %) based on the sequence and functional information reported: apoA-I [9–24]/D<sup>9</sup>-RVKDLATVYVDVLKD<sup>24</sup> (abbreviated in the present study as DRV<sup>(9–24)</sup>), apoA-I[45–63]/K<sup>45</sup>-LLDNWDSVTSTFSKLREQ<sup>63</sup> (abbreviated in the present study as KLL<sup>(45–63)</sup>), and apoA-I[221–239]/V<sup>221</sup>-LESFKVSFLSALEEYTKK<sup>239</sup> (abbreviated in the present study as VLES<sup>(221–239)</sup>) (GenScript Corporation Piscataway, NJ). Lyophilized peptides were dissolved at 1 mg/mL and diluted to a final concentration of 200  $\mu$ g/mL in ultrapure water (18.2 M $\Omega$ -cm, pH 6.8), in the presence of 20 mM 1-lauroyl-2-hydroxy-*sn*-glycero-3-phosphocholine (Lyso-C<sub>12</sub>PC, CAS RN: 20559-18-6) or 40 % 2,2,2-trifluoroethanol (TFE, CAS RN: 75-89-8). Protein concentrations were determined measuring absorbance at 280 nm.

### *In silico* analysis

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

### Circular dichroism spectroscopy

Far-ultraviolet (UV) circular dichroism (CD) spectra were recorded on an Aviv 62DS spectropolarimeter in a 0.1 cm quartz cell using an average time of 2.5 s and a step size of 0.5 nm over a wavelength range of 190–260 nm. Sample concentration was determined before each CD measurement and following baseline correction, ellipticity was converted to mean molar ellipticity ( $\Theta$ , deg cm<sup>2</sup> dmol<sup>-1</sup>). Secondary structure content was calculated at 190–260 nm

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

### Transmission electron microscopy and atomic force microscopy

Samples of peptide solutions in water were collected after 0, 24, 48, 72, 96 h and 120 days of incubation at 4 °C and observed using transmission electron microscopy (TEM) with a JEM-1200EX11 JEOL microscope (70 kV) and atomic force microscopy (AFM) performed with an AFM Digital Instruments/Veeco. Peptide solutions for TEM were deposited on carbon-coated transmission electron microscopy grids and stained with 2 % uranyl acetate. Aliquots of peptide solutions in water were deposited onto freshly cleaved mica, dried under laminar flow for 5 min, and visualized by AFM. Images were obtained using a Multimode microscope (Digital Instruments/Veeco) and a Nano Scope IIIa (Digital Instruments/Veeco) control system. Images (5.0 × 5.0 μm) were obtained in contact mode at a scan frequency of 2 Hz using silicon nitride (Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>) AFM tips.

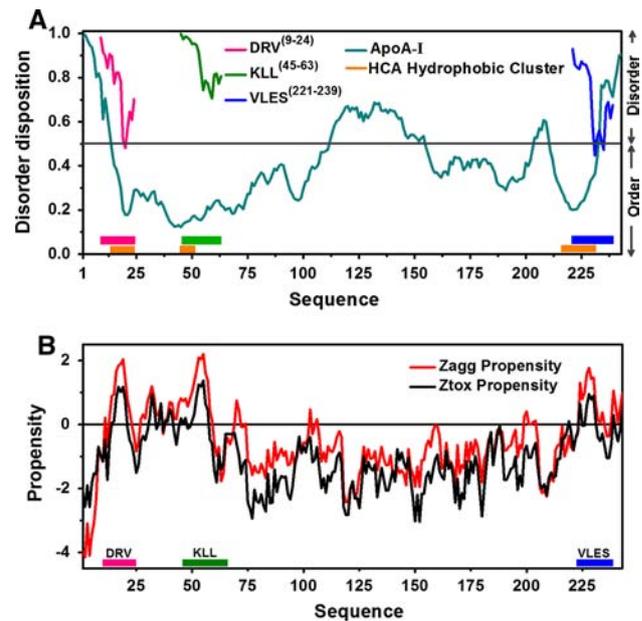
### Viability assays and optical microscopy

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

## Results

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

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



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

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

### Circular dichroism

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

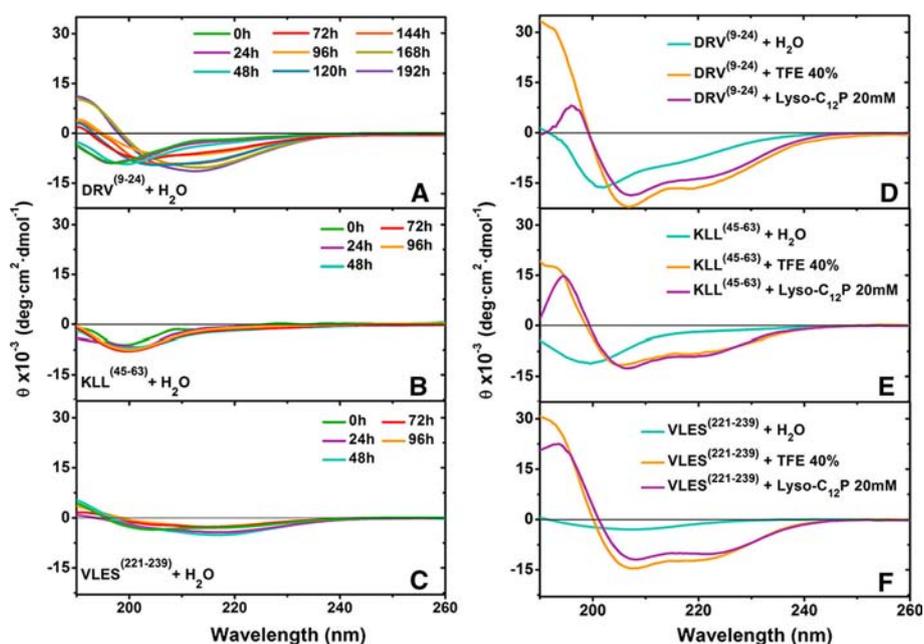
**Table 1** Physicochemical properties of peptides DRV<sup>(9–24)</sup>, KLL<sup>(45–63)</sup>, and VLES<sup>(221–239)</sup>

Peptide	DRV (9–24)	KLL (45–63)	VLES (221–239)
Amino acid sequence <sup>a</sup>	<b>DRV</b> <b>KDL</b> <b>ATV</b> <b>YVD</b> <b>V</b> <b>LKD</b>	<b>KLL</b> <b>DNW</b> <b>DS</b> <b>VT</b> <b>ST</b> <b>FS</b> <b>KL</b> <b>REQ</b>	<b>VLES</b> <b>FK</b> <b>VS</b> <b>F</b> <b>L</b> <b>S</b> <b>A</b> <b>L</b> <b>E</b> <b>E</b> <b>Y</b> <b>T</b> <b>KK</b>
Average charge	−1	0	0
Average hydrophobicity (kcal/mol)	−0.116	−0.151	0.118
Hydrophobic moment $\mu$ H (kcal/mol)	0.490	0.280	0.390
Steric zipper <sup>b</sup> hydrophobicity (kcal/mol)	0.675	0.218	0.664
Zag propensity $\log K$ (s <sup>−1</sup> )	−4.3	−4.5	−3.2
Aromatic (X) and positive polar (P) amino acids position into the peptide sequence	• <b>P</b> • <b>P</b> • • • • • <b>X</b> • • • • • <b>P</b> •	<b>P</b> • • • • • <b>X</b> • • • • • <b>X</b> • <b>P</b> • <b>P</b> • •	• • • • • <b>X</b> <b>P</b> • • • • • <b>X</b> • • • • • <b>X</b> • <b>P</b> <b>P</b>
Globular structure formation	Yes	Yes	Yes
Fibril formation	Yes	No	Yes
Cytotoxicity	Medium	Poor	High

<sup>a</sup> amino acids: positive (blue), negative (red), polar uncharged (green), aromatic (yellow)

<sup>b</sup> The steric zipper is underlined

**Fig. 2** Far-UV CD spectra of apoA-I derived peptides. **a–c** Spectra of peptide DRV<sup>(9–24)</sup>, KLL<sup>(45–63)</sup>, and VLES<sup>(221–239)</sup> incubated for various times in water. **d–f** CD spectra of peptides DRV<sup>(9–24)</sup>, KLL<sup>(45–63)</sup>, and VLES<sup>(221–239)</sup> incubated for 24 h in 40 % TFE and 20 mM Lyso-C<sub>12</sub>PC



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

structures. The CD spectra deconvolution of DRV<sup>(9–24)</sup>, KLL<sup>(45–63)</sup>, and VLES<sup>(221–239)</sup> in water displayed a mixture of  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -sheet, and disordered structures (Table 2). In

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

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

TFE (2,2,2-Trifluoroethanol), Lyso-C<sub>12</sub>PC (1-lauroyl-2-hydroxy-*sn*-glycero-3-phosphocholine).  $\alpha$  ( $\alpha$ -helix),  $\beta$  ( $\beta$ -sheet), rc (random coil). Secondary structure percentages were estimated using the circular dichroism neural network (CDNN) based software

the presence of Lyso-C<sub>12</sub>PC and TFE, the three peptides showed a clear minimum at 208 and 222 nm and a maximum at 195 nm, characteristic of an  $\alpha$ -helix (Fig. 2d–f). Lyso-C<sub>12</sub>PC strongly promoted the recovery of secondary structure from a disordered conformation with all peptides tested. Optimal recoveries occurred with peptide VLES<sup>(221–239)</sup>, whereas the weakest one was shown by peptide KLL<sup>(45–63)</sup> (Fig. 2d–f).

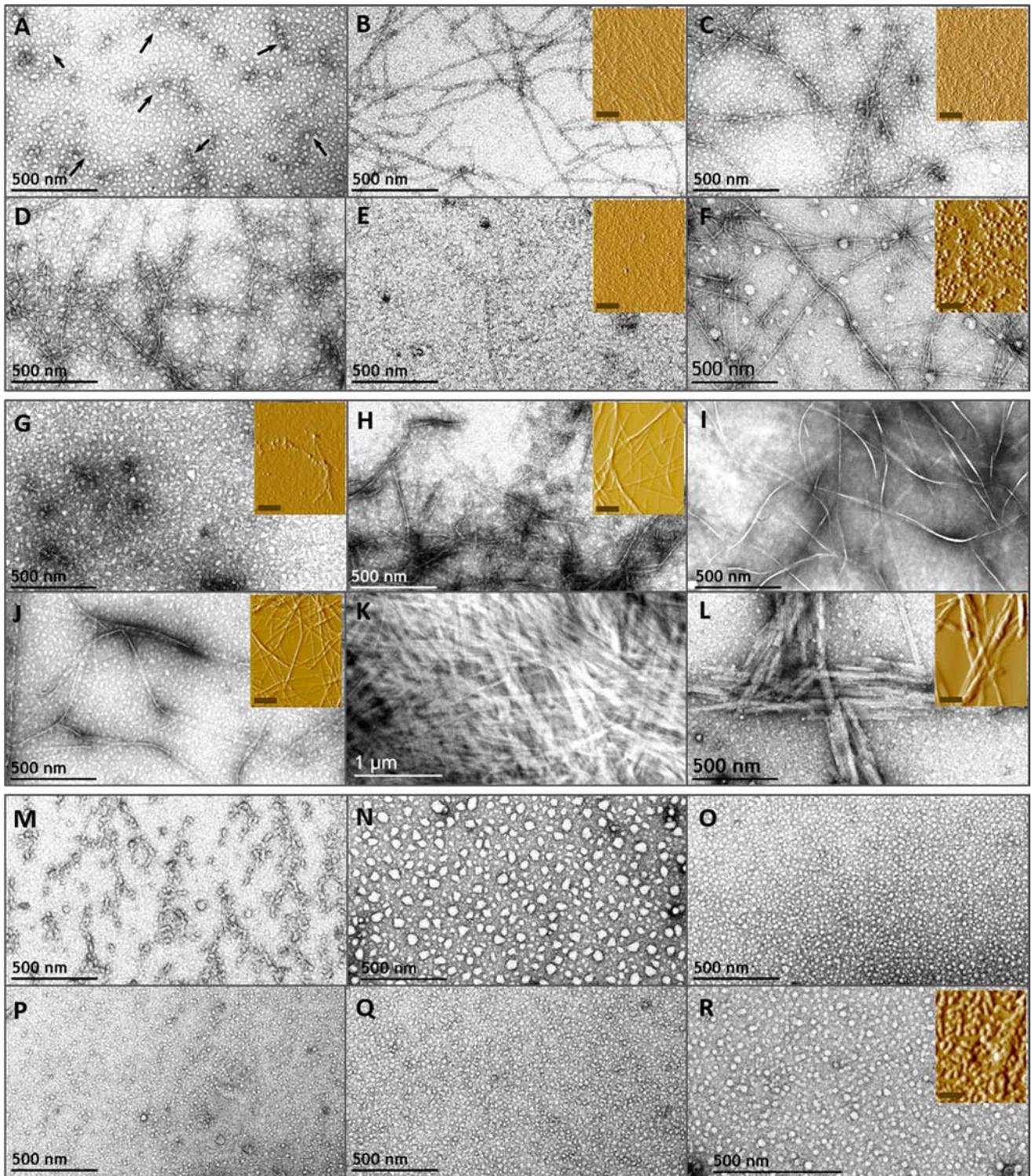
#### Peptide aggregates observed by TEM and AFM

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

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

#### MTT cell viability assay and optical microscopy

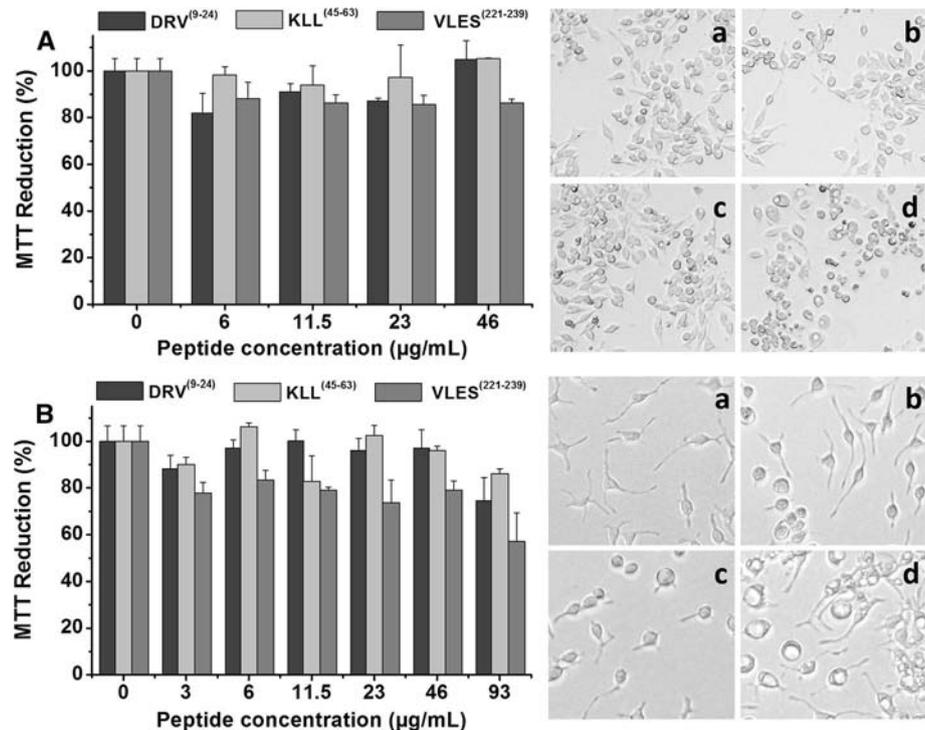
As previously reported by us employing the  $\beta$ -amyloid peptide, cytotoxic effects of aggregates formed by DRV<sup>(9–24)</sup>, KLL<sup>(45–63)</sup> and VLES<sup>(221–239)</sup> were evaluated on macrophage and microglial cells [27], following the reduction of MTT as an indirect indicator of cellular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



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

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

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



## Discussion

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

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

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

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

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

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

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

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

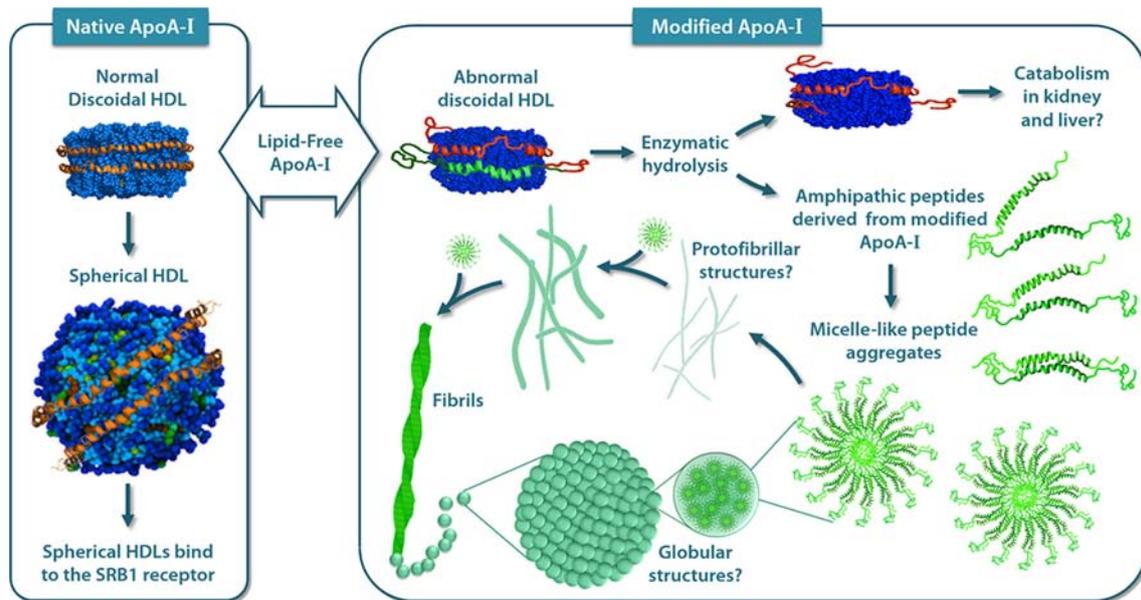
N-terminal, two aromatic amino acids, and several non-polar residues resembling the phospholipid polar head might promote the formation of “peptide micelles” [47]. It has been established that electrostatic interactions between positive residues located at the protein and the presence of negatively charged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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

## References

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

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

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