



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

Síntesis y caracterización de la variante de la Apolipoproteína A-I (APO A-I Zaragoza) y análisis de posibilidades de uso farmacológico

Autora

Sarah Fiddymment Puertas

Director/es

García Otín, Angel Luis
Pocovi Mieras, Miguel

Facultad de Ciencias.
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular
2011

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

FACULTAD DE CIENCIAS

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR Y
CELULAR**



TESIS DOCTORAL

**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LA VARIANTE DE
LA APOLIPOPROTEÍNA A-I (APO A-I ZARAGOZA) Y
ANÁLISIS DE POSIBILIDADES DE USO
FARMACOLÓGICO**

Memoria presentada por:

SARAH FIDDYMENT PUERTAS

Licenciada en Bioquímica
para optar al
Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza

2011

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Enfermedades cardiovasculares y aterosclerosis	1
1.1.1. Consideraciones epidemiológicas	1
1.1.2. Aterosclerosis como principal causa de enfermedad cardiovascular	1
1.1.3. Desarrollo de la lesión	1
1.1.4. Clasificación de lesiones ateroscleróticas	4
1.1.5. Factores de riesgo	5
1.2. Lipoproteínas de alta densidad	9
1.2.1. Situación en el contexto del metabolismo lipídico	9
1.2.2. Composición y estructura	10
1.2.3. Biogénesis.....	13
1.2.4. Subclases.....	15
1.3. Transporte reverso de colesterol	17
1.3.1. Eflujo de colesterol en tejidos periféricos.....	17
1.3.2. Remodelación de las HDL.....	19
1.3.3. Captación hepática de colesterol	20
1.4. Otras funciones antiaterogénicas de las HDL	22
1.4.1. Función Antioxidante	22
1.4.2. Función Antiinflamatoria	23
1.4.3. Acción Antitrombótica	23
1.4.4. Acción Anticoagulante	24
1.4.5. Función Estabilizadora del endotelio	24
1.5. Apolipoproteína A-I	25
1.5.1. Estructura de la apo A-I	25
1.5.2. Mutaciones y variantes de la apo A-I	27
1.5.3. Posible utilidad farmacológica de la apo A-I Milano	28
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	31
3. MATERIAL Y MÉTODOS	35
3.1. Construcción de Plásmidos	35
3.1.1. Plásmido de expresión de apo A-I nativa.....	36
3.1.2. Construcción del Plásmido de expresión de la apo A-I Zaragoza	44
3.2. Expresión Proteica y Purificación.....	54
3.2.1. Expresión e Inducción.....	54
3.2.2. Purificación.....	55

3.3. Formación de Partículas Reconstituidas (rHDL).....	58
3.3.1. Partículas HDL reconstituidas sin marcar.....	58
3.3.2. rHDL fluorescentes.....	59
3.4. Caracterización Proteica.....	59
3.4.1. Caracterización estructural.....	59
3.4.2. Caracterización Funcional.....	62
4. RESULTADOS.....	69
4.1. Construcción de Plásmidos.....	69
4.1.1. Obtención de los plásmidos de expresión para apo A-I nativa y apo A-I Z... 69	
4.1.2. Análisis del inserto por detección de colonias positivas mediante PCR.....	72
4.1.3. Comprobación del sentido del inserto y secuenciación.....	73
4.1.4. Construcción del fragmento A.....	74
4.1.5. Subclonaje en el plásmido de expresión.....	74
4.2. Expresión Proteica.....	75
4.2.1. Inducción de cultivo de células BL21 (DE3).....	75
4.2.2. Purificación de proteína en columnas de Níquel.....	76
4.3. Evaluación del Proceso de Purificación.....	78
4.4. Caracterización Proteica.....	79
4.4.1. Comprobación de la mutación L144R mediante espectrometría de masas .	79
4.4.2. Geles no desnaturizantes.....	82
4.4.3. Desnaturalización Térmica.....	83
4.4.4. Análisis del tamaño de partícula.....	88
4.4.5. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....	88
4.4.6. Cromatografía de exclusión molecular.....	89
4.4.7. Comparación del eflujo de colesterol promovido por apo A-I nat y apo A-I Z91	
4.4.8. Comparación de la capacidad de cesión de colesterol de partículas reconstituidas con apo A-I nat y apo A-I Z.....	92
5. DISCUSIÓN.....	97
6. CONCLUSIONES.....	109
7. REFERENCIAS.....	113
8. ANEXO.....	135

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución de la lesión aterosclerótica	2
Figura 2. Tipos de lesión aterosclerótica	5
Figura 3. Biogénesis de HDL.....	14
Figura 4. Subclases de HDL.....	16
Figura 5. Transporte reverso de colesterol	17
Figura 6. Vías de eflujo de colesterol de los macrófagos.....	18
Figura 7. Remodelación de las HDL.....	20
Figura 8. Catabolismo de las HDL	21
Figura 9. Estructura primaria de la apo A-I	26
Figura 10. Estructura secundaria de la apo A-I.....	26
Figura 11. Estructura terciaria de la apo A-I.....	27
Figura 12. Plásmido pET-45	35
Figura 13. Secuencia de apo A-I incluida en pET-45	37
Figura 14. Programa de PCR tipo Touchdown	39
Figura 15. Programa de PCR de colonias	42
Figura 16. Sistema de mutagénesis para la generación de apo A-I Z.	45
Figura 17. Plásmido pSCB.....	47
Figura 18. Esquema del método del clonaje utilizado	48
Figura 19. Posibles formas de inserción de los fragmentos B y C en el vector pSCB.	50
Figura 20. Secuencia de apo A-I Z incluida en pET-45	53
Figura 21. Imágen obtenida de citometría de flujo.....	66
Figura 22. Esquema de la generación de plásmidos	70
Figura 23. Productos de PCR resultado de modificación o mutagénesis.....	72
Figura 24. PCR de colonias	73
Figura 25. Esquema del Subclonaje en plásmidos de expresión	75
Figura 26. Inducción de cultivo	76
Figura 27. PAGE-SDS de las etapas de purificación proteica.....	77

Figura 28. Western blot de las etapas de purificación proteica	77
Figura 29. Espectros de MALDI-TOF MS en modo lineal	80
Figura 30. Espectros de MALDI-TOF MS en modo reflectante	81
Figura 31. Electroforesis en gel no-desnaturalizante de gradiente de poliacrilamida 4-12%.....	83
Figura 32. Gráficas representativas de la desnaturalización térmica	85
Figura 33. Imágenes de rHDL Z obtenida por TEM.....	89
Figura 34. Distribución de tamaños de rHDL Z obtenidas por TEM.....	89
Figura 35. Perfiles cromatográficos	90
Figura 36. Representación gráfica del porcentaje de eflujo de colesterol en distintas condiciones y tiempos.	92
Figura 37. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células HepG2.....	93
Figura 38. Captación de colesterol por células HepG2 a distintos tiempos y concentraciones.....	94

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencias de cebadores para la construcción del plásmido de expresión de la apo A-I nat.	38
Tabla 2. Cantidades y concentraciones de los reactivos utilizados en la reacción de PCR.....	38
Tabla 3. Reactivos empleados en la digestión de los apo A-I nat y pET-45.	39
Tabla 4. Reactivos de la reacción de ligación.....	41
Tabla 5. Secuencia de cebadores empleados en la PCR de colonias	41
Tabla 6. Cantidades y concentraciones de los reactivos utilizados en la reacción de PCR.....	42
Tabla 7. Secuencias de cebadores para la construcción de del plásmido de apo A-I Z.	45
Tabla 8. Secuencia de cebadores empleados en la PCR de colonias	49
Tabla 9. Reactivos empleados en la digestión de los plásmidos M1 y M2.....	50
Tabla 10. Reactivos de la reacción de ligación	51
Tabla 11. Reactivos empleados en la primera digestión del plásmido Apo A-I Z y pET-45.	52
Tabla 12. Reactivos para la preparación de partículas rHDL	59
Tabla 13. Tabla de purificación de las proteínas.....	79
Tabla 14. Datos obtenidos de la medición de tamaño de partícula.....	88

ABREVIATURAS

Aa: aminoácidos

ACAT: Acil-coenzima A:colesterol aciltransferasa

Apo A-I nat: Apo A-I nativa

Apo A-I Z: Apo A-I Zaragoza

Apo A-I: Apolipoproteína A-I

Apo A-II: Apolipoproteína A-II

Apo A-IV: Apolipoproteína A-IV

Apo E: Apolipoproteína E

CETP: Proteína Transferidora de Ésteres de Colesterol

c-HDL: Colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad

CHO: Células de ovario de ratón chino

c-LDL: Colesterol en LDL

DM: Diabetes Mellitus

DO: Densidad óptica

ECACC: Colección Europea de Cultivos Celulares

E.coli: Escherichia coli

eNOS: Sintasa endotelial de óxido nítrico

HTA: Hipertensión arterial

HUVEC: Células endoteliales de vena de cordón umbilical humana

IDL: Lipoproteínas de densidad intermedia

INA: Instituto de Nanociencia de Aragón

IPTG: Isopropil- β -D-tiogalactósido

LCAT: Lecitin:colesterol acil transferasa

LDL-ox : Lipoproteínas de baja densidad oxidadas

LE: Lipasa endotelial

LH: Lipasa hepática

LPL: Lipoprotein lipasa

LXR: Receptores hepáticos X

MCP-1: Proteínas quimotácticas de monocitos-1

M β CD: Metil- β -Ciclo-Dextrina

NBD-colesterol: 22-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-23,24-bisnor-5-cholen-3 β -ol

NCEP: Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol

NO: Óxido nítrico

PAD: Presión arterial diastólica

PAF: Factor activador de plaquetas

PAF-AH: Acetil hidrolasa-factor activador de plaquetas

PAGE-SDS: Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS

PAS: Presión arterial sistólica

Pb: Pares de bases

PBS: Tampón fosfato salino

PCA: Proteína C activada

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PLTP: Proteína Transferidora de Fosfolípidos

PMA: Forbol 12-miristato 13-acetato

PON: Paraxonasa

PON-1: Paraxonasa-1

PON-3: Paraxonasa-3

POPC: Palmitoleilfosfatidilcolina

rHDL: Partículas de HDL reconstituidas

SAA: Proteína amiloidea sérica A

SDS: Dodecilsulfato sódico

SFB: Suero Fetal Bovino

SM: Síndrome metabólico

SR-BI: Receptores "*scavenger*" de clase B tipo I

TEM: Microscopia Electrónica de Transmisión

TFA: Ácido trifluoracético

TG: Triglicéridos

VCAM-1: Molécula de adhesión celular-1

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES Y ATEROSCLEROSIS

1.1.1. Consideraciones epidemiológicas

Actualmente la aterosclerosis es la enfermedad con mayor prevalencia en el mundo occidental, y en los últimos años la cifra de afectados en el resto del mundo ha aumentado drásticamente. Se estima que cada año mueren 17 millones de personas en el mundo a causa de enfermedades cardiovasculares entre los que se encuentran las embolias e infartos de miocardio [1].

La enfermedad coronaria es sin duda la que más mortalidad ocasiona, y ésta se debe principalmente a la aterosclerosis. Por esta razón, la aterosclerosis se ha convertido en un foco de atención importante en la investigación biomédica, y la búsqueda de fármacos anti-aterogénicos una de las metas más importantes.

1.1.2. Aterosclerosis como principal causa de enfermedad cardiovascular

Se denominan enfermedades cardiovasculares todo tipo de enfermedades relacionadas con el corazón o los vasos sanguíneos. Aunque las enfermedades cardiovasculares puedan contar con varias causas, la más común sin duda es la aterosclerosis. Esta causa es tan frecuente que se considera casi sinónimo de la enfermedad cardiovascular.

El término aterosclerosis proviene de los vocablos griegos *athero* ('pasta') y *skleros* ('duro, piedra'). Consiste en una respuesta inflamatoria crónica en la pared de las arterias de mediano y gran calibre, debido al depósito de lipoproteínas cargadas de colesterol [2-4]. Estos depósitos con el tiempo se convierten en auténticas lesiones y forman la placa ateromatosa. Esta placa al hacerse cada vez más grande va obstruyendo la luz de la arteria hasta que se ve afectado el flujo de sangre de tal forma que se produce un infarto en la zona por falta de riego. Además corre el riesgo de que la placa se desestabilice y se rompa produciendo así trombos que pueden obstruir vasos de menor tamaño.

1.1.3. Desarrollo de la lesión

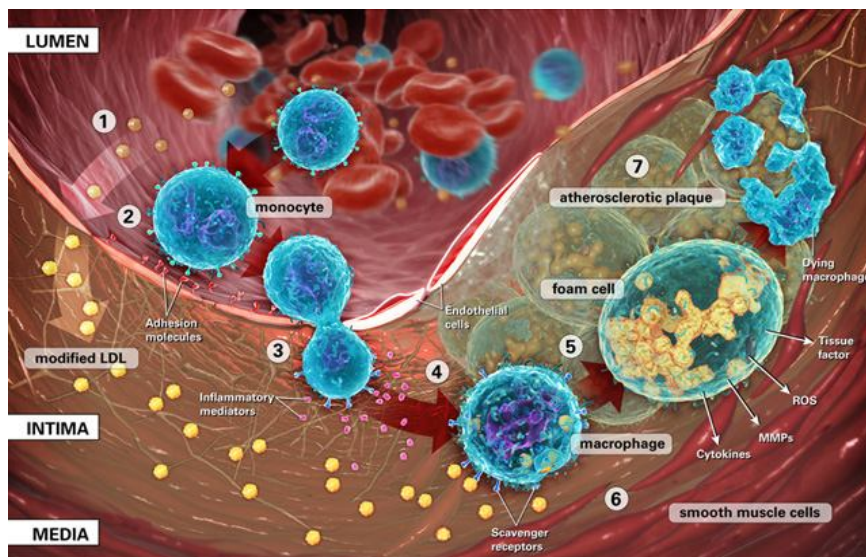
El desarrollo de lesiones ateroscleróticas se debe a sutiles pero continuos desgastes o daños al endotelio vascular. Esto puede deberse a un aumento de la presión sanguínea en zonas determinadas del árbol arterial como pueden ser las ramificaciones arteriales,

sobretudo en personas con hipertensión o por estrés inflamatorio implicando tanto células del sistema inmune como agentes pro-inflamatorios como las lipoproteínas oxidadas (Figura 1).

El endotelio es una capa de células que regula el intercambio de agua y pequeñas moléculas entre la sangre y los tejidos, el tono vascular, la coagulación y la fibrinólisis [5].

La lesión aterosclerótica comienza cuando el endotelio de una zona determinada se activa y se hace permeable, volviéndose disfuncional. Incluso algunas células pueden desaparecer dejando zonas desnudas de endotelio [6, 7].

Figura 1. Evolución de la lesión aterosclerótica



La figura muestra la evolución de la lesión aterosclerótica desde la adherencia y penetración de los monocitos a la íntima hasta la generación de células espumosas. (http://www.invivo.ca/illustration_and_print_formation_of_atherosclerosis.html)

En el ambiente disfuncional del endotelio las moléculas plasmáticas penetran al espacio subendotelial, donde son modificadas (principalmente oxidadas) convirtiéndose en moléculas potencialmente pro-inflamatorias y quimioatrayentes. Este endotelio activado expresa moléculas de adhesión, principalmente la molécula de adhesión celular-1 (VCAM-1) que contribuyen al reclutamiento de células plasmáticas circulantes a la lesión aterosclerótica [3, 4].

Aunque la VCAM-1 actúa como molécula de adhesión al endotelio, no es suficiente para que las células plasmáticas puedan penetrar al espacio subendotelial. Para ello es

necesaria la presencia de quimioquinas, siendo las más importantes las lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDL-ox) y las proteínas quimiotácticas de monocitos-1 (MCP-1) que estimulan a las células monocíticas de la sangre a penetrar el endotelio y allí convertirse en macrófagos capaces de fagocitar el colesterol oxidado a través de los receptores *scavenger*. Los macrófagos acaban por sobrecargarse de colesterol y se transforman en células espumosas, que finalmente mueren por sobrecarga debido a que los receptores *scavenger* no están regulados por el acumulo de colesterol intracelular. Además de los receptores *scavenger*, los macrófagos poseen propiedades desestabilizadoras y trombogénicas por medio de la expresión de enzimas proteolíticas de degradación de la matriz (p.ej. metaloproteinasas de matriz) y factor tisular. Este acumulo de células espumosas da lugar a estrías grasas como la primera manifestación evidente macroscópicamente de inicio de lesión aterosclerótica [3].

La lesión inicial de estría grasa suele cursar de forma asintomática y para que evolucione la lesión, a esta respuesta inmunoinflamatoria se le une una respuesta fibroproliferativa mediada por células musculares lisas en la íntima.

Aunque inicialmente estas células tienen una función reparadora tras lesiones arteriales, una señal inmunoinflamatoria prolongada puede hacer que esta respuesta sea tan voluminosa que obstruya la luz de los vasos, comprometiendo el flujo sanguíneo y finalmente terminando con isquemia de la zona [8].

Sin embargo estas células musculares también tienen un efecto positivo, ya que la matriz extracelular rica en colágeno que producen confiere estabilidad a la placa, protegiéndola de posibles rupturas y consiguientes trombosis [9].

En las etapas avanzadas de la lesión se puede producir en algunas ocasiones calcificación de la placa. El calcio es el componente más rígido de los circundantes de la placa aterosclerótica, y potencialmente podría actuar como un foco de ruptura de placa. Sin embargo, no se ha observado una ruptura excesiva en placas calcificadas e incluso podría asociarse a placas más estables [10].

En etapas avanzadas de aterosclerosis la angiogénesis es frecuente, y posiblemente caracterice a las placas de mayor riesgo [7, 11]. Los nuevos vasos suelen generarse a partir de los vasa vasorum en la adventicia de los vasos. Estos nuevos vasos son frágiles y permeables, y al expresar moléculas de adhesión favorecen la extravasación de las proteínas plasmáticas además de los eritrocitos y células inflamatorias. Por lo tanto, la angiogénesis e inflamación frecuentemente coexisten y podrían mediar la rápida progresión detrimental de la placa [7, 11, 12].

Además, las lesiones avanzadas se caracterizan por su inestabilidad, pudiendo producirse su ruptura dando lugar a trombos que, transportados por el flujo sanguíneo, pueden obstruir vasos de menor tamaño provocando episodios isquémicos agudos como infartos de miocardio o ictus aterotrombótico [7].

1.1.4. Clasificación de lesiones ateroscleróticas

Dependiendo de su aspecto histológico, las lesiones se clasifican en seis tipos (Figura 2) [13-15]:

Tipo I: Son las primeras lesiones que se manifiestan en forma de depósitos lipídicos detectables de forma microscópica y química en la íntima. Además se producen los primeros infiltrados de leucocitos mononucleares.

Tipo II: Estas lesiones son conocidas como estrías grasas. Contienen capas adyacentes de macrófagos o células espumosas a diferencia de las lesiones tipo I donde solo aparecen como grupos aislados. También se aprecian células musculares lisas en la media e íntima y algunas presentan gotas de grasa intracelulares. Además se observan linfocitos T y mastocitos.

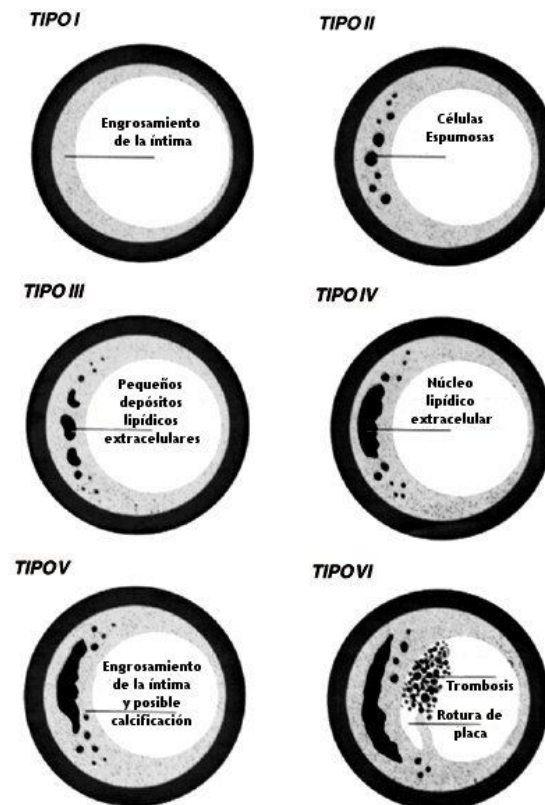
Tipo III: Conocida también como lesión intermedia, o preateroma. Presenta gránulos lipídicos extracelulares que rompen la integridad de las células musculares, produciendo un engrosamiento de la íntima.

Tipo IV: Estas lesiones son también conocidas como ateroma, y son caracterizados por un gran núcleo lipídico extracelular formado por la confluencia de los gránulos lipídicos generados en la lesión tipo III. El núcleo lipídico provoca el engrosamiento de la pared arterial, aunque no a expensas del lumen.

Tipo V: Las lesiones tipo V se caracterizan por el desarrollo de una capa fibrosa sobre el núcleo lipídico generándose la llamada fibroateroma o lesión tipo Va. Si partes de la lesión están calcificadas se denominan lesiones tipo Vb. Aquellas lesiones que carecen de núcleo lipídico se denominan Vc. Estas lesiones se acompañan de un estrechamiento del lumen, principalmente provocado por el aumento de tejido fibroso extracelular, en especial por la mayor presencia de colágeno y células musculares lisas.

Tipo VI: Se producen cuando a las lesiones tipo V se les suma la rotura de la superficie de la lesión (VIa), un hematoma o hemorragia (VIb) o el desarrollo de depósitos tromboticos (VIc). Son la mayor causa de morbi-mortalidad producida por aterosclerosis.

Figura 2. Tipos de lesión aterosclerótica



Esquema de los tipos de lesión ateroscleróticas en función de su estadio de evolución. Adaptado de Stary H et al. *Circulation* 1995; 92:1355-1374.

1.1.5. Factores de riesgo

Los factores genéticos son uno de los principales factores de riesgo para padecer aterosclerosis, sin embargo en muchos casos no son suficientes para manifestar la enfermedad, sino que además debe estar presente alguno de los siguientes factores de riesgo:

Hipercolesterolemia

La importancia del colesterol como uno de los principales factores patogénicos en el desarrollo y progresión de la lesión aterosclerótica fue señalado por primera vez a mediados del siglo XIX por el patólogo alemán Virchow [16]. A la mitad del siglo XX, con el aumento en la incidencia de la patología derivada de enfermedad aterosclerótica, este paradigma fue ganando aceptación hasta llegar a ser considerado uno de los principales factores de riesgo asociados con la progresión de la aterosclerosis y la incidencia de enfermedad cardiovascular. Actualmente, el aumento de colesterol en

sangre debido al aumento en la concentración de colesterol en LDL (c-LDL) es aceptado como el principal factor de riesgo de enfermedad aterosclerótica [17-19] y aunque su efecto es reversible ya que si se reduce su nivel con fármacos o dieta, el riesgo de morbi-mortalidad desciende.

Hipertensión arterial

La prevalencia de hipertensión arterial (HTA), en población general española es del 35%, considerando como hipertensos a aquellos sujetos con presión arterial sistólica (PAS) y/o diastólica (PAD) igual o mayor de 140 y 90 mm Hg respectivamente o en tratamiento farmacológico antihipertensivo.

En pacientes hipertensos, la concentración de angiotensina II, el principal metabolito resultante de la estimulación del eje renina-angiotensina, esta generalmente elevada. La angiotensina II actúa antagonizando el efecto del óxido nítrico, aumentando la producción de endotelina por estímulo directo en las células endoteliales y provocando el crecimiento de las células musculares lisas por lo que se cree que es responsable del engrosamiento de la capa media arterial [20]. Mediante la unión con un receptor específico la angiotensina II produce un aumento en la síntesis de proteínas dentro de estas células, además de su contracción e hipertrofia [21].

La HTA tiene actividad proinflamatoria añadida al asociarse con un aumento en la formación de peróxido de hidrógeno y radicales libres. Estas sustancias disminuyen la formación de óxido nítrico en el endotelio, aumentan la adhesión de leucocitos y las resistencias periféricas [22, 23]. En zonas con alteración de la tensión hemodinámica en la pared arterial aumenta la expresión de moléculas de adhesión y genes inflamatorios por parte de las células endoteliales.

Tabaquismo

El consumo de tabaco constituye uno de los principales riesgos para la salud cardiovascular y es la principal causa de morbi-mortalidad prematura y prevenible en el mundo desarrollado.

El hábito tabáquico se ha asociado con mayores concentraciones de colesterol total y menores de colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad (c-HDL), así como con hipertrigliceridemia postprandial [24], mayor agregación plaquetaria y actividad vasomotora [25]. En los últimos estudios epidemiológicos se ha relacionado además con nuevos marcadores de riesgo emergentes tales como la proteína C reactiva, homocisteína y fibrinógeno [26].

La acción proaterogénica de los productos derivados del humo del tabaco se ejerce principalmente en el tejido elástico de la pared arterial disminuyendo la cantidad de elastina y aumentando la actividad elastasa por la activación de proteasas de neutrófilos [27]. En este contexto la relación encontrada entre tabaquismo y prevalencia de aneurismas de aorta se debería a la disminución de tejido elástico en la pared. También se han observado alteraciones en la función del endotelio arterial en respuesta a estímulos vasoactivos en fumadores respecto a no fumadores [28]. Los fumadores presentan lesiones más evolucionadas que los no fumadores, cualquiera que sea el estadio en que se comparen, por lo que se puede concluir que el tabaco influye en la evolución de las lesiones ateroscleróticas desde fases iniciales hasta lesiones avanzadas [29, 30].

Diabetes mellitus

El diagnóstico de diabetes mellitus (DM) se establece cuando los valores de glucosa en sangre en ayunas son superiores a 125 mg/dl en al menos dos determinaciones realizadas en dos días diferentes o bien cuando alcanzan los 200 mg/dl en cualquier determinación o a las dos horas de realizar una sobrecarga oral de 75 mg de glucosa [31]. Los sujetos con DM no controlada presentan una evolución más acelerada de la enfermedad aterosclerótica debido a diferentes mecanismos como hiperglucemia, perfil lipídico aterogénico y aumento de la inflamación [32]. La incidencia de enfermedad cardiovascular y la mortalidad en sujetos con DM es equivalente a la de aquellos sujetos no diabéticos que han sufrido un episodio isquémico vascular [19, 33].

La hiperglucemia aumenta la expresión de genes proinflamatorios en células endoteliales, monocitos y células musculares lisas. Además, en estudios *in vitro*, se ha comprobado que promueve la oxidación de LDL, la proliferación de macrófagos y de células musculares lisas que promueve la producción de moléculas de la matriz implicadas en la evolución de la aterosclerosis [32]. A pesar de estos fenómenos no se ha observado beneficio en la mortalidad por enfermedad cardiovascular con el control intensivo de la glucemia en sujetos con DM de larga evolución respecto a aquellos que recibieron tratamiento convencional [34].

La aceleración en la evolución de la aterosclerosis además puede atribuirse al perfil lipídico de estos pacientes. Si bien la elevación en las concentraciones de c-LDL son moderadas, se ha comprobado la eficacia del tratamiento hipolipemiante en la prevención cardiovascular consiguiendo una reducción en la incidencia de enfermedad cardiovascular de entre un 25 y 50 % [35]. El riesgo cardiovascular puede atribuirse en

parte al perfil lipídico característico de estos pacientes: mayores concentraciones de triglicéridos y LDL pequeñas y densas y bajas de c-HDL [36, 37].

Vida sedentaria

El ejercicio físico modifica muchos factores de riesgo, y en última instancia disminuye la respuesta inflamatoria en la pared de las arterias aunque los mecanismos de acción no se conocen por completo. Varios estudios han demostrado la importancia del ejercicio en la disminución de la disfunción endotelial e inflamación vascular y esto podría explicar el beneficio observado en pacientes con enfermedad coronaria cuando practican ejercicio de forma regular [38-41].

Obesidad

La obesidad es un factor de riesgo independiente de enfermedad cardiovascular. Se ha descrito un incremento continuo y gradual del riesgo relativo de mortalidad con el aumento del índice de masa corporal debido a su asociación con el síndrome metabólico (SM) [42, 43].

Desde hace dos décadas se ha observado un importante aumento en el número de sujetos con síndrome metabólico a lo largo de todo el mundo en relación con la obesidad y DM [44]. Para el diagnóstico de SM se requiere que en un mismo sujeto confluyan diferentes factores: altas concentraciones de triglicéridos, bajas de c-HDL, hiperglucemia, HTA y obesidad de distribución abdominal [45].

Proteína C Reactiva

La proteína C reactiva es una proteína producida por los hepatocitos y adipocitos cuya concentración en sangre se eleva con el aumento de actividad inflamatoria. Aunque en un comienzo se consideró un marcador no específico de inflamación, varios estudios han sugerido su papel central en distintos pasos del desarrollo y progresión de la enfermedad aterosclerótica: inducción de disfunción endotelial, formación de células espumosas, inhibición de la diferenciación de células endoteliales progenitoras o activación del complemento en la placa aterosclerótica entre otros [46]. Apoyando esta hipótesis se ha observado la asociación entre la presencia de placas en arteria carótida y proteína C reactiva en varones de población general de edad media [47]. También se ha observado su aumento en pacientes con mayor cantidad de tejido adiposo, en relación con el estímulo de adipocinas y otras citoquinas que modifican la respuesta inflamatoria [48]. Su elevación parece estar relacionada con la complicación aguda de la lesión aterosclerótica, y con la activación de la placa aterosclerótica más que con el

posible daño miocárdico [49]. Los valores de proteína C reactiva se correlacionan con la elevación de troponinas, la complicación de la placa detectada mediante imagen intracoronaria y con peor pronóstico clínico a corto y medio plazo [50].

Hormonas sexuales

Se ha demostrado que las hormonas masculinas tienen propiedades aterogénicas, mientras que los estrógenos protegen de la aterosclerosis, por eso las mujeres se afectan después de la menopausia [51, 52]. Este factor junto con la edad no depende del estilo de vida.

Factores protectores

Contrarrestando el efecto de estos factores de riesgo y otros que no hemos revisado, existen también factores protectores. El más importante de estos es el nivel de c-HDL. La importancia de las HDL como factor protector radica en el hecho que estas lipoproteínas retiran colesterol de los tejidos y los transporta al hígado [53].

Se han establecido unos criterios para determinar el riesgo de enfermedad coronaria de cada persona en función de los niveles de HDL. Desde 1950 se había observado una correlación inversa de HDL con enfermedad cardiovascular pero no fue hasta 1970 cuando esta idea se aceptó y se establecieron los siguientes límites según el Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol (NCEP) [54, 55]:

[c-HDL] < 35 mg/dL es un factor de riesgo **positivo** para enfermedad coronaria.

[c-HDL] > 60 mg/dL es un factor de riesgo **negativo** para enfermedad coronaria

Para profundizar sobre estos factores de riesgo vamos a analizar el metabolismo lipídico así como la estructura y función de las proteínas implicadas.

1.2. LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD

1.2.1. Situación en el contexto del metabolismo lipídico

Las partículas HDL en un principio fueron caracterizadas utilizando ultracentrifugación del plasma, donde se separaban las distintas lipoproteínas según su densidad, de allí proviene su nombre de lipoproteínas de alta densidad [56]. Ya desde los años 70 se conoce la relación inversa existente entre la concentración de c-HDL plasmático y la enfermedad cardiovascular y desde los años 80 se ha considerado como factor de riesgo clásico de la aterosclerosis [57, 58].

Los niveles de c-HDL varían en un rango muy amplio en la población y esta variación se debe en gran parte a factores genéticos. Solo se han determinado un número muy limitado de genes que influyen en la variación de concentraciones de c-HDL, y estos lo hacen generalmente afectando a su tasa de catabolismo [59].

A lo largo de los años ha surgido el debate acerca de si los niveles bajos de c-HDL son un mero marcador de riesgo cardiovascular o por lo contrario que sea un causante de riesgo elevado. Se cree que la HDL puede inhibir directamente la aterosclerosis, a través del mecanismo del transporte reverso de colesterol. Este mecanismo fue descrito por Glomset por primera vez en 1968 [60]. Consiste en un mecanismo de "recogida" de colesterol de los tejidos periféricos por las partículas HDL, y su transporte hacia el hígado donde finalmente puede ser excretado a través de la bilis y las heces. Años más tarde Ross y Glomset sugirieron que el transporte reverso de colesterol podría ser un mecanismo protector frente al desarrollo de la aterosclerosis [61] pero fueron Miller y Miller quienes propusieron que la HDL podría proteger contra la aterosclerosis promoviendo el transporte reverso colesterol [57]. Más recientemente se han descrito una variedad de nuevas funciones de la HDL que incluyen funciones antiinflamatorias, antioxidantes, antitrombóticas y mecanismos inductores de la síntesis de óxido nítrico [59, 62, 63].

1.2.2. Composición y estructura

Las HDL son lipoproteínas compuestas por aproximadamente 50% de proteína y 50% de lípidos. Su tamaño oscila entre 5 y 12 nm de diámetro y su masa esta entre 200 y 400 kDa. Son las lipoproteínas más pequeñas y más ricas en contenido proteico.

Las principales proteínas que forman los HDL son:

Apolipoproteína A-I (Apo A-I)

Constituye aproximadamente un 70% de la parte proteica de las HDL. Las principales funciones de las partículas HDL son desempeñadas por la apo A-I y estos incluyen: la unión a lípidos, eflujo de colesterol de tejidos periféricos, activación de la lecitin:colesterol acil transferasa (LCAT) y el reconocimiento de los receptores hepáticos [64].

Apolipoproteína A-II (Apo A-II)

Es la segunda proteína mayoritaria de las HDL, y existe como un homodímero unido por un puente disulfuro [65]. Su papel fisiológico en el desarrollo de la aterosclerosis es

controvertido, pero generalmente se acepta que la apo A-II es proaterogénica e inhibe las funciones protectoras de la HDL, incluida su capacidad antioxidante [64, 66].

Apolipoproteína E (Apo E)

La mayor parte de las partículas HDL no contienen apo E, sin embargo, una fracción sí contiene apo E y la cantidad de apo E presente en las HDL es considerada un factor predictivo independiente de eventos cardiovasculares recurrentes [67]. Por lo tanto, la presencia de apo E en partículas HDL podría reducir la capacidad antiaterogénica debido a un aumento en la facilidad de ser atrapadas por los proteoglicanos de la matriz extracelular vascular [68].

Apolipoproteínas C

Se ha demostrado que la apo C-II y C-III están involucradas en la regulación de la actividad de la lipoprotein lipasa (LPL) y los niveles séricos de triglicéridos [69]. Incrementos drásticos de los triglicéridos (TG) de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y disminuciones importantes de c-HDL se han relacionado con sobreexpresión de apoC-III, sugiriendo que la composición específica de las apolipoproteínas podría influir en la calidad de las lipoproteínas [64]. Recientemente se ha demostrado que la adición de apoC-II a HDL reconstituidas induce cambios estructurales y en las funciones de las HDL, sobre todo referentes a la activación de LCAT (Lecitín:Coolesterol Aciltransferasa) [70].

Apolipoproteína A-IV (Apo A-IV)

La apo A-IV se sintetiza en los enterocitos presentes en el intestino delgado. Una vez en circulación, solo el 25% de apo A-IV pasa a formar parte de las HDL mientras que el 75% se mantiene como fracción libre en plasma [71]. Se han propuesto diferentes funciones para apo A-IV, incluyendo transporte lipídico, metabolismo de lipoproteínas y control de la ingesta. Recientemente se ha relacionado a la apo A-IV con la inhibición de la oxidación de lípidos [72], sugiriendo que la proteína podría tener importantes implicaciones en la protección frente al desarrollo de aterosclerosis. Además, sujetos con enfermedad coronaria presentan concentraciones más bajas de apo A-IV en plasma que sujetos sanos [73], reforzando la idea de la ateroprotección. El papel antiaterogénico de apo A-IV reside también en su capacidad antiinflamatoria aunque el mecanismo molecular que explique estas propiedades todavía no se conoce.

Proteína Transferidora de Ésteres de Colesterol (CETP)

La CETP promueve la redistribución y equilibración de los lípidos hidrofóbicos en el núcleo de las lipoproteínas como son los triglicéridos y ésteres de colesterol entre las HDL y las VLDL, LDL y las lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) [74]. Más específicamente su actividad sobre las partículas HDL es de depleción de ésteres de colesterol, enriquecimiento con triglicéridos, y una reducción neta del tamaño de la partícula de HDL. La CETP se considera un factor proaterogénico, y se ha propuesto que su inhibición podría aumentar los niveles de c-HDL [75].

Proteína Transferidora de Fosfolípidos (PLTP)

La proteína transferidora de fosfolípidos plasmática actúa remodelando las partículas HDL y regenerando aceptores primarios de colesterol [76, 77]. Además de convertir a las HDL en partículas grandes y pequeñas, la PLTP media la transferencia neta de fosfolípidos [78] y α -tocoferol [79] entre las distintas lipoproteínas e incrementa la transferencia de ésteres de colesterol de las HDL a las VLDL, mediada por la CETP [80].

Lecitín:Colesterol Aciltransferasa (LCAT)

La LCAT cataliza la transferencia del ácido graso de la posición 2 de la lecitina a la molécula de colesterol. La LCAT es una enzima fundamental en el transporte reverso de colesterol, responsable de la esterificación del colesterol libre a ésteres de colesterol en las HDL, facilitando así la maduración de las partículas nacientes [64]. El principal cofactor activador de la LCAT es la apo A-I [81].

Paraxonasa (PON)

La PON es una enzima dependiente de calcio asociada a la HDL, con una demostrada actividad antioxidante. Cataliza la hidrólisis de ácidos grasos oxidados de los fosfolípidos y evita la acumulación de lípidos oxidados en lipoproteínas, particularmente la LDL [82].

Acetil hidrolasa-factor activador de plaquetas (PAF-AH)

Es una enzima que está involucrada en las funciones antioxidantes y antiinflamatorias asociadas a la superficie de las HDL [83]. Esta enzima desempeña dos funciones vitales contra el proceso de oxidación de estas partículas. En primer lugar hidroliza al factor activador de plaquetas (PAF), que es un potente mediador de fosfolípidos con propiedades pro-inflamatorias. En segundo lugar la enzima participa en la degradación de fosfolípidos oxidados [84].

Otras proteínas de la HDL

También hay cantidades traza de apolipoproteína D [85], apolipoproteína J (clusterina) [86], y proteína amiloidea sérica A (SAA) [87, 88].

1.2.3. Biogénesis

La biogénesis de las partículas HDL es muy compleja (Figura 3) e involucra la síntesis y secreción de los componentes proteicos mayoritarios de la HDL seguida de la adquisición de lípidos extracelulares (principalmente fosfolípidos y colesterol) y el ensamblaje y generación de partículas HDL maduras [59]. Como se ha descrito antes, las proteínas mayoritarias de las HDL son la apolipoproteína A-I y A-II, y ambas son necesarios para la biogénesis de HDL. La apo A-I esta presente en prácticamente todas las partículas HDL [89], por lo que no es sorprendente descubrir que la delección del gen *APOA1* causa una reducción drástica de c-HDL tanto en ratones [90] como en humanos [91].

La apo A-I es sintetizada tanto en intestino como en hígado pero la contribución relativa del intestino y del hígado a la cantidad total de apo A-I plasmática es desconocida. La sobreexpresión hepática de apo A-I aumenta significativamente los niveles de c-HDL e inhibe la progresión e incluso permite la regresión de la aterosclerosis en ratones [92, 93].

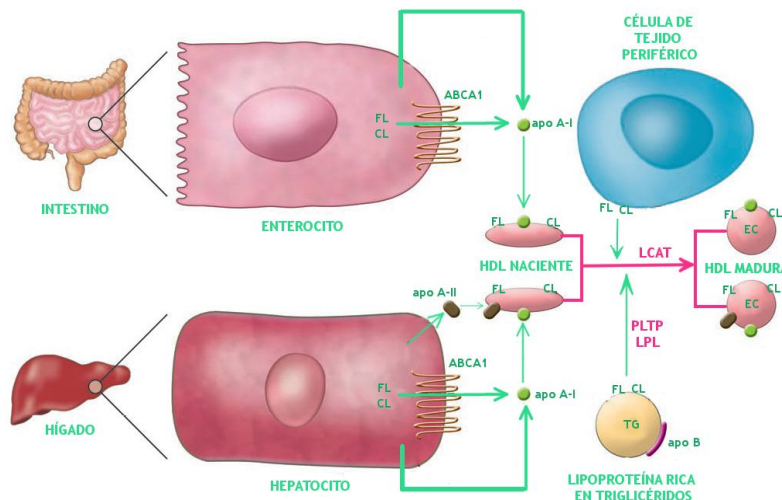
La apo A-II solo esta presente en dos tercios de las partículas HDL en humanos, y es sintetizada únicamente en el hígado. La delección del gen *Apoa2* en ratones reduce drásticamente los niveles de c-HDL [94] lo que sugiere que la apo A-II también es necesaria para la biosíntesis y metabolismo normal de las HDL.

Las apolipoproteínas recién secretadas necesitan adquirir lípidos (fosfolípidos y colesterol) para generarse las partículas HDL. Esto ocurre principalmente justo después de la secreción y un participante crítico en este proceso es el transportador ABCA1. La ausencia de ABCA1 es la causa de la enfermedad de Tangier [95-97] que esta asociado a niveles extremadamente bajos de c-HDL y apo A-I. La tasa de producción de apo A-I en la enfermedad de Tangier es normal, pero la apo A-I es catabolizada de forma extremadamente rápida [98].

Aunque se exprese de forma generalizada, el transportador ABCA1 en hígado e intestino aparentemente es el responsable de la mayor parte de la lipidación inicial de la apo A-I pobre en lípidos recién sintetizada [59].

Aunque el hígado y el intestino son imprescindibles para la lipidación inicial de apo A-I a través del transportador ABCA1, las partículas HDL obtienen gran parte de su masa lipídica de otras fuentes, incluidas otros tejidos y otras lipoproteínas (Figura 3).

Figura 3. Biogénesis de HDL



Adaptado de Rader. "Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies". J. Clin. Invest. 2006. Fosfolípidos, FL; colesterol libre, CL; ésteres de colesterol, EC.

Se conoce muy poco sobre las fuentes o mecanismos de lipidación extrahepática de las HDL. Los macrófagos, las células más importantes que participan en el eflujo de colesterol desde el punto de vista de la aterosclerosis, contribuyen poco en la masa de colesterol de las HDL. Sin embargo, todas las células extrahepáticas necesitan colesterol pero no pueden metabolizarlo por si mismos, y necesitan eliminarlo por medio del proceso de eflujo de colesterol a las HDL. Por lo tanto, los contribuyentes más importantes al contenido de colesterol de las HDL, fuera del hígado e intestino, son los órganos grandes como el músculo esquelético, tejido adiposo y piel [59].

Las HDL también captan lípidos, especialmente fosfolípidos, de otras lipoproteínas (Figura 3). Cuando las lipoproteínas ricas en triglicéridos sufren la hidrólisis de sus triglicéridos, los fosfolípidos de la superficie son adquiridos por las HDL. Por lo tanto, la actividad de la lipoproteína lipasa esta asociada de forma inversa a los niveles de c-HDL [89]. Los fosfolípidos obtenidos de las lipoproteínas son transferidos a las HDL por medio de la actividad de la PLTP [99].

Se han propuesto varios modelos que describen la unión de la apo A-I a los fosfolípidos formando una bicapa lipídica [100-102], siendo el modelo de cinturón el más aceptado.

En este modelo, dos moléculas de apo A-I en orientación antiparalela envuelven a un disco formado por una bicapa fosfolipídica [103].

Maduración

Para que las HDL puedan madurar necesitan esterificar el colesterol que contienen para formar el núcleo hidrofóbico de las HDL, y esto lo lleva a cabo la LCAT [81]. Los ésteres de colesterol son muy hidrofóbicos y migran hacia el núcleo de la partícula a medida que se forman. Esto convierte a las HDL discoidales en partículas esféricas grandes que son las predominantes en el plasma humano [104]. Esta esterificación también produce una depleción de colesterol en la superficie de las HDL, generando un gradiente favorable para que el colesterol de otras lipoproteínas y membranas celulares pueda pasar a las HDL, asegurando así una fuente continua de colesterol no esterificado para la reacción de la LCAT.

1.2.4. Subclases

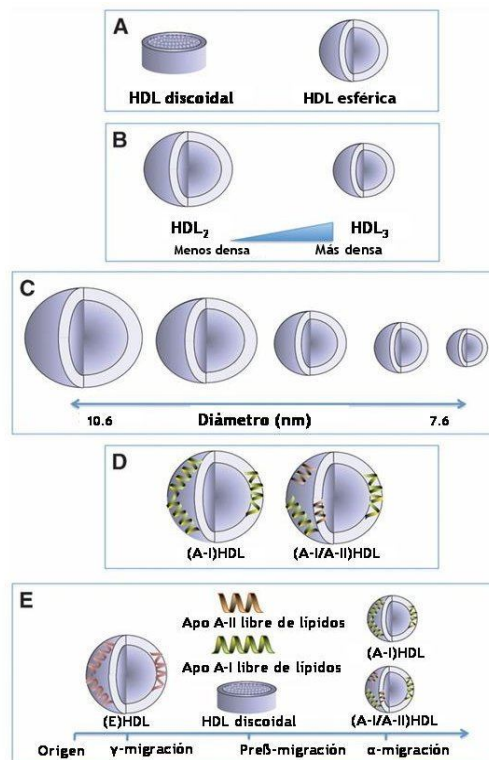
Como hemos comentado, las partículas esféricas de HDL contienen un núcleo de lípidos neutros (ésteres de colesterol y triglicéridos en menor proporción) rodeados por una monocapa de fosfolípidos, colesterol no esterificado y apolipoproteínas (Figura 4.A).

Hay numerosas formas de clasificar a las partículas HDL. Estas incluyen densidad, tamaño de partícula, composición de apolipoproteínas y carga.

Densidad

Cuando las partículas son separadas por medio de la técnica de ultracentrifugación según su densidad, se generan dos subpoblaciones mayoritarias: HDL₂ y HDL₃, siendo las HDL₂ más grandes y menos densas que las HDL₃ (Figura 4.B).

Figura 4. Subclases de HDL



Adaptado de Rye et al. "The metabolism and anti-atherogenic properties of HDL". J. Lipid Res. 2009. Clasificación de las partículas HDL según: A) Forma, B) Densidad, C) Tamaño, D) Composición y E) Carga de superficie.

Tamaño de partícula

También se pueden clasificar las HDL en función de su tamaño separándose en un gel electroforético de gradiente no desnaturante, observándose cinco subpoblaciones distintas con tamaños comprendidos entre 7.6-10.6 nm de diámetro (Figura 4.C) [105].

Apolipoproteínas

Las HDL del plasma humano también se clasifican en función de sus principales apolipoproteínas, apo A-I y apo A-II, en dos poblaciones de partículas: aquellas que contienen apo A-I pero no apo A-II, (A-I)HDL and aquellos que contienen apo A-I y apo A-II, (A-I/A-II)HDL (Figura 4.D) [106].

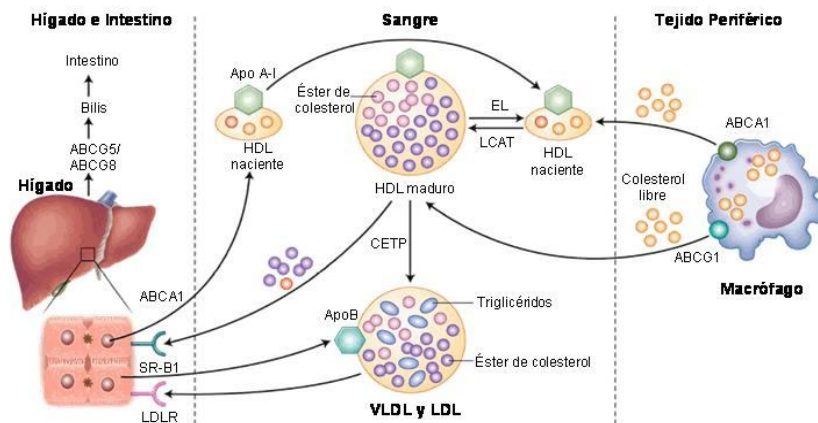
Carga de superficie

Las HDL también se pueden separar por medio de electroforesis en gel de agarosa, donde se separan en función de su carga superficial, migrando a las posiciones γ -, α - o pre β - (Figura 4.E) [107].

1.3. TRANSPORTE REVERSO DE COLESTEROL

Como se ha comentado antes, la función principal de las partículas HDL es el transporte reverso de colesterol. Este mecanismo permite la vehiculización de colesterol de tejidos periféricos al hígado donde es catabolizado. El proceso tiene tres etapas principales: el eflujo de colesterol de tejidos periféricos, el transporte plasmático, y la captación del colesterol por células hepáticas.

Figura 5. Transporte reverso de colesterol



Adaptado de Khera y Rader. "Future Therapeutic Directions in Reverse Cholesterol Transport". *Curr. Atheroscler. Rep.* 2010.

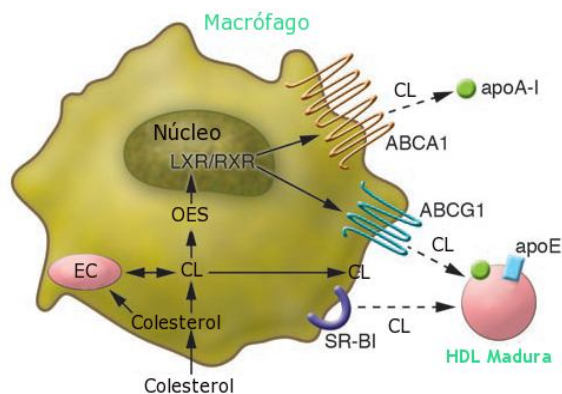
1.3.1. Eflujo de colesterol en tejidos periféricos

Aunque el transporte reverso de colesterol de macrófagos representa solo una pequeña fracción del eflujo total, es de especial importancia dado el papel fundamental que juegan las células espumosas en el desarrollo de la aterosclerosis [108-110].

La vía más estudiada de eflujo de colesterol de los macrófagos es la del transportador ABCA1 que promueve la salida de colesterol hacia la apo A-I pobre en colesterol [59].

Los principales reguladores de la expresión del gen de ABCA1 son los receptores hepáticos $X\alpha$ ó $X\beta$ (LXR α y LXR β), que actúan como heterodímeros con el receptor retinoide X [111] (Figura 6).

Figura 6. Vías de eflujo de colesterol de los macrófagos



Adaptado de Rader. "Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies". J. Clin. Invest. 2006. Colesterol libre, CL; ésteres de colesterol, EC; Oxisteroles, OS.

Los LXR son activados de forma endógena por los oxisteroles, que a su vez son generados a partir del colesterol tras varias etapas enzimáticas. Tanto los oxisteroles como agonistas sintéticos de LXR son capaces de aumentar la transcripción de ABCA1 en macrófagos y así provocar un aumento del eflujo de colesterol hacia la apo A-I pobre en lípidos.

Sin embargo, in vivo la mayor parte de apo A-I no es pobre en lípidos, sino esta formando partículas de HDL maduras. Recientemente se ha establecido que otro miembro de la familia de transportadores ABC, ABCG1, es capaz de promover el eflujo de colesterol de macrófagos hacia las HDL maduras [112, 113] por un mecanismo desconocido.

Aparentemente los transportadores ABCA1 de macrófagos contribuyen poco a la lipidación total de las HDL, y por consecuencia a los niveles de c-HDL [114], pero sí que es importante para la protección frente a la aterosclerosis. Sin embargo, la deficiencia de ABCA1 a nivel hepático en ratones redujo drásticamente los niveles de c-HDL en un 80% [115]. Por lo tanto ABCA1 hepático parece ser crítico para la lipidación inicial de la apo A-I pobre en lípidos recién sintetizado, protegiéndolo de la rápida degradación y permitiendo que se convierta en HDL madura. La sobreexpresión de ABCA1 en hígado aumentó los niveles de c-HDL [116, 117] y en macrófagos e hígado se asoció con la protección contra aterosclerosis [118-120].

Los receptores "scavenger" de clase B, tipo I (SR-BI) también juegan un papel importante mediando el eflujo celular de colesterol hacia las HDL maduras [121], pero

la influencia del eflujo mediado por los SR-BI de los macrófagos sobre el metabolismo de las HDL y el transporte reverso de colesterol todavía no ha sido definitivamente establecida.

1.3.2. Remodelación de las HDL

Como ya hemos comentado, existen numerosos factores plasmáticos que intervienen en la denominada remodelación de las HDL, incluyendo la LCAT, CETP, PLTP, lipasa hepática (LH) y la lipasa endotelial (LE) (Figura 7).

Uno de los principales hechos en la remodelación de estas partículas es la disociación de la apo A-I pobre en lípidos de la HDL esférica por medio de la acción de la CETP, PLTP, y LH [122]. La apo A-I pobre en lípidos representa un 5% de la apo A-I total en plasma, y es capaz de aceptar colesterol y fosfolípidos que salen por medio del eflujo de membranas celular a través el transportador ABCA1. La lipidación progresiva de la apo A-I por esta vía genera HDL discoidal y recicla la apo A-I de nuevo a la fracción de HDL, reduciendo así la tasa por la que apo A-I es eliminada de la circulación y ayuda a mantener los niveles circulantes de HDL [104].

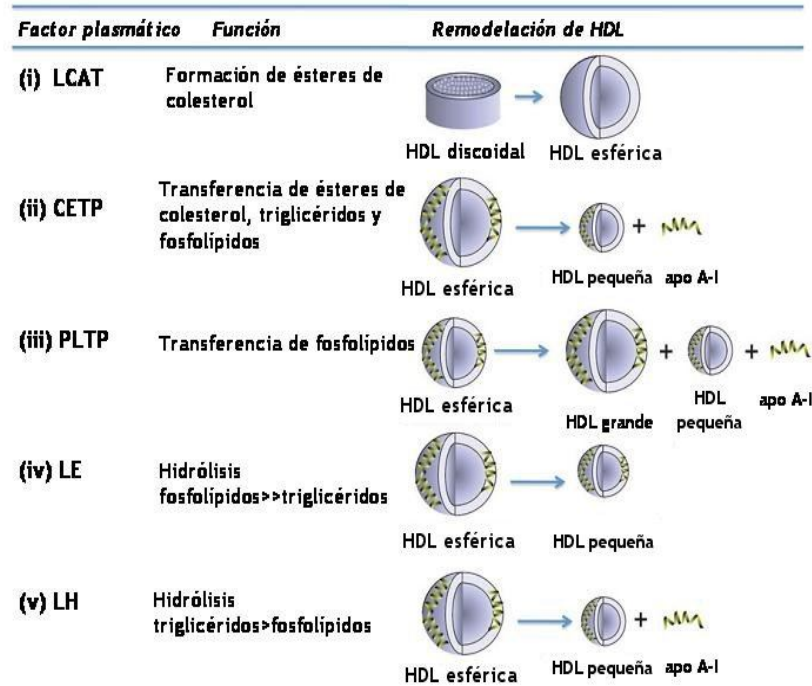
La CETP es la encargada de transferir ésteres de colesterol y triglicéridos entre las HDL, y las VLDL y las LDL [123]. Cuando los niveles de VLDL son elevados, la CETP media la transferencia de lípidos del núcleo lipídico de las HDL hacia las VLDL, generando así unas HDL pobres en lípidos del núcleo pero ricas en triglicéridos. Esta composición da lugar a un exceso de componentes de superficie y por lo tanto una estructura lábil. Esto es rectificado por la disociación de la apo A-I pobre en lípidos para así reducir el tamaño de las HDL. Estas HDL ricas en triglicéridos también son un sustrato idóneo para la lipasa hepática que actúa reduciendo aun más el tamaño de las HDL a través de la hidrólisis de triglicéridos (Figura 7) [124]. La CETP también puede remodelar las HDL en partículas más pequeñas por medio de un proceso de fusión que no involucra la disociación de la apo A-I pobre en lípidos [125].

La PLTP transfiere fosfolípidos entre las HDL y VLDL y también entre distintas partículas de HDL. Esta proteína es capaz de remodelar las HDL hacia partículas grandes o pequeñas por medio de la fusión de partículas y la disociación de apo A-I pobre en lípidos (Figura 7) [126].

La lipasa endotelial y la LH remodelan las HDL formando partículas más pequeñas, aunque la LH lo hace con más eficacia que la LE. La LH se diferencia de la LE en que su principal sustrato son los triglicéridos mientras que la LE actúa principalmente sobre los

fosfolípidos [127]. La LE también se diferencia de la LH porque no disocia la apo A-I pobre en lípidos de la HDL (Figura 7) [127, 128].

Figura 7. Remodelación de las HDL

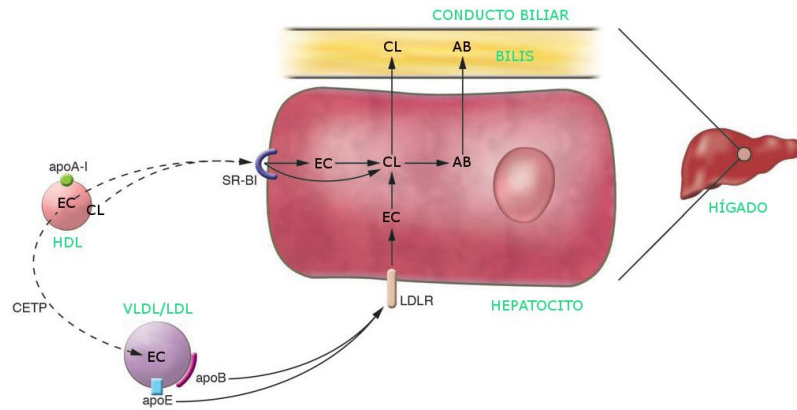


Adaptado de Rye et al. "The metabolism and anti-atherogenic properties of HDL". J. Lipid Res. 2009. Influencia de los distintos factores plasmáticos sobre la distribución de las subpoblaciones de HDL.

1.3.3. Captación hepática de colesterol

La última etapa del transporte reverso de colesterol es la captación de las partículas HDL por parte del hígado (Figura 8). El mecanismo de captación mejor estudiado es el mediado por los receptores "scavenger" tipo BI [129]. Estos receptores realizan una captación selectiva, siendo capaces de coger colesterol de las partículas HDL, tanto libre como esterificado, sin degradar las apoproteínas durante el proceso.

Figura 8. Catabolismo de las HDL



Adaptado de Rader. "Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies". J. Clin. Invest. 2006. Colesterol libre, CL; ésteres de colesterol, EC; ácidos biliares, AB.

Sucesivos estudios han demostrado que los receptores "scavenger" internalizan las partículas HDL por completo y una vez dentro, separan el colesterol del resto de la partícula, finalmente secretando sólo partículas pequeñas de HDL empobrecidas en colesterol [130]. Tras numerosos estudios de diversos tipos en ratones [131-134], se ha llegado a la conclusión que, a nivel terapéutico, el flujo de colesterol a través de las diferentes rutas de catabolismo de la HDL podría ser más importante que la concentración plasmática del c-HDL circulante. Esta idea hace pensar que la sobreexpresión del receptor hepático SR-BI podría ser antiaterogénica a pesar de cursar con niveles más bajos de c-HDL.

En humanos, hay al menos una vía alternativa por la cual el c-HDL es metabolizado y transportado hacia el hígado, y es la ruta mediada por la CETP. La CETP se encarga de intercambiar triglicéridos desde lipoproteínas que contienen apo B (LDL y VLDL) por colesterol esterificado de las HDL, resultando en el enriquecimiento de las HDL en triglicéridos y empobrecimiento de ésteres de colesterol. La importancia de la CETP en el metabolismo de las HDL fue descubierta gracias a los individuos que tienen una deficiencia genética de la CETP [135, 136]. Estos individuos tienen mutaciones de pérdida de función en ambos alelos del gen de la CETP y presentan niveles muy altos de c-HDL. Además sus HDL son muy grandes y su catabolismo está decelerado [137]. Estos estudios impulsaron la generación de inhibidores de la CETP como tratamiento farmacológico frente a la aterosclerosis. El caso con mayor repercusión fue el del Torcetrapib, evaluado en el estudio ILLUMINATE [138]. La acción del fármaco para inhibir la CETP fue exitosa, incrementando hasta un 70% la concentración de c-HDL, sin embargo la tasa de mortalidad de los pacientes aumentó significativamente provocando

la suspensión del estudio. A pesar de estos resultados negativos, el estudio ILLUMINATE fue importante para valorar la importancia de elevar el c-HDL, revelando a su vez la importancia del mecanismo por el se obtiene este aumento, ya que, el aumento de HDL disfuncionales no supone ningún beneficio frente a la aterosclerosis.

A pesar de esto, se ha continuado desarrollando fármacos basados en la inhibición de CETP, como son el caso de Dalcetrapib y Anacetrapib. A diferencia de Torcetrapib, estos fármacos inhiben la CETP a través de un mecanismo distinto, siendo Anacetrapib un inhibidor reversible mientras que Dalcetrapib es un inhibidor irreversible. Sus novedosos mecanismos de acción, farmacocinética, tolerancia y potenciales efectos cardioprotectores contribuyen positivamente a su uso en pacientes con dislipidemias, aunque más ensayos clínicos serán necesarios para evaluar los posibles efectos adversos [139].

1.4. OTRAS FUNCIONES ANTIATEROGÉNICAS DE LAS HDL

Además de su función principal de transporte reverso del colesterol, a la HDL se le ha atribuido otras funciones potencialmente antiaterogénicas que se describen a continuación.

1.4.1. Función Antioxidante

La capacidad antioxidante de las HDL esta mediada principalmente por su capacidad de unir y transportar las moléculas oxidadas. Esta función es llevada a cabo por su proteína mayoritaria, la apo A-I. Varios estudios han demostrado su capacidad de eliminar lípidos hidroperoxidados de las LDL *in vitro* así como, también tras su administración intravenosa en ratones *in vivo* y tras su infusión en humanos también [140, 141]. Estos lípidos hidroperoxidados son transportados a los hepatocitos donde son rápidamente catabolizados. Además las HDL son transportadoras de enzimas con capacidad para catabolizar los peróxidos que son las causantes de la oxidación de las LDL, convirtiéndolas en un agente proaterogénico [142]. Estas enzimas incluyen la paraxonasa-1 (PON-1) [143, 144], la paraxonasa-3 (PON-3) [145] y posiblemente la fosfolípido glutatión peroxidasa [142]. No obstante, el factor más importante en la acción antioxidante de las HDL es la apo A-I. Es capaz de ejercer un efecto antioxidante independiente de la paraxonasa, gracias a su poder reductor debido sus residuos de metionina [146].

1.4.2. Función Antiinflamatoria

Como ya se ha descrito, la aterosclerosis es una enfermedad causada por inflamación crónica. Por tanto, una de las funciones más importantes de la HDL podría estar basada en sus propiedades antiinflamatorias, que actúan en todas las etapas relacionadas con la inflamación del sistema vascular.

Estudios *in vitro* han demostrado que las partículas HDL son capaces de inhibir la expresión de moléculas de adhesión por parte de las células endoteliales activadas. Tanto las HDL nativas como las reconstituidas inhibieron la expresión, inducida por citoquinas, de las moléculas de adhesión VCAM-1, ICAM-1 y E-selectina en las células endoteliales de vena de cordón umbilical humana (HUVEC), de manera dependiente a la dosis [147-149]. Además las HDL son capaces de inhibir la expresión del factor aórtico de activación de macrófagos (MCP-1) como respuesta a las LDL oxidadas [150, 151]. Recientemente se ha demostrado que la HDL es capaz de actuar directamente sobre los monocitos previniendo las respuestas inflamatorias de los mismos [152]. En este trabajo se ha puesto de manifiesto que las HDL son capaces de inhibir la expresión de la integrina de membrana de los monocitos CD11b.

1.4.3. Acción Antitrombótica

Los mecanismos moleculares por los cuales las HDL ejercen sus efectos antitrombóticos, son múltiples [62, 153, 154] y se relacionan con las tres categorías de los procesos conocidos como la triada de Virchow, que contribuyen a la formación de trombos. Las categorías son: (1) disfunción de las células de la pared vascular, en particular de las endoteliales, (2) flujo sanguíneo alterado y (3) disfunción de componentes sanguíneos. Muchas de las actividades protectoras de las HDL de las dos primeras categorías involucran a su capacidad de promocionar el buen funcionamiento de las células endoteliales y vasoregulación, mediado por su efecto sobre el óxido nítrico (NO) [63].

Además de promocionar la producción de NO, la HDL aumenta la síntesis de las prostaciclinas [155, 156], pudiendo así modificar las trombosis u otros eventos vasculares. Las prostaciclinas actúan de manera sinérgica con el NO para inducir la relajación de la musculatura vascular lisa, inhibir la activación de plaquetas y disminuir la producción de factores de crecimiento que estimulan la proliferación local de las células musculares lisas de los vasos [157].

Las partículas HDL también ejercen efectos antitrombóticos distintos a la regulación de prostaciclinas. Actúan directamente sobre las células endoteliales, por una parte

contribuyendo a la regulación negativa de la expresión de selectina-E [62, 158] en su superficie, y por otro lado, inhiben la expresión de factores tisulares inducidos por la trombina [158]. Además pueden prevenir la apoptosis de estas células, evitando así la generación de micropartículas de debris apoptótico que son plenamente protrombóticas [159-161].

1.4.4. Acción Anticoagulante

Las HDL desempeñan funciones anticoagulantes, *in vitro*, aumentando la inactivación del factor de coagulación V_a purificado producida por la proteína C activada (PCA) y la proteína S, frenando así la generación de trombina y evitando la formación de coágulos de fibrina [162]. Por otra parte las partículas HDL son capaces de aumentar la expresión de trombosmodulina en las células endoteliales, que es un factor anticoagulante adicional y que induce la síntesis de PCA e inhibe la generación de trombina [163]. De forma adicional, las HDL pueden promover la fibrinólisis mediante la regulación negativa del inhibidor del activador de plasminógeno-I y favoreciendo la expresión del activador tisular del plasminógeno [164, 165]. Por último, las HDL también desempeñan acciones antiplaquetarias *in vivo* [166, 167]. Se cree que sus mecanismos de acción pueden ser tanto directos [168], como indirectos, actuando sobre la activación de plaquetas a través de las células endoteliales [164].

1.4.5. Función Estabilizadora del endotelio

Uno de las funciones más recientemente descubiertas de las HDL, es su actividad sobre el endotelio vascular. Los efectos beneficiosos que aporta a este nivel son numerosos, incluyendo la modulación de la sintasa endotelial de óxido nítrico (eNOS) y la regulación de la proliferación, migración y apoptosis de las propias células endoteliales.

Modulación de la eNOS

Múltiples líneas de investigación indican que el óxido nítrico es ateroprotector y que su deficiencia está críticamente involucrada en la patogenia de la enfermedad vascular hipercolesterolemica [169, 170]. Las partículas HDL pueden promover la producción de eNOS por una variedad de mecanismos. Primero, las HDL regulan la distribución subcelular de eNOS además de regular el entorno lipídico donde se encuentra en las caveolas, asegurando su correcto funcionamiento [171-173]. Segundo, las HDL evitan el desacoplamiento de eNOS propiciado por las partículas LDL que provocaría una mayor producción de radicales libres a costa de producción de NO [173-175]. En tercer lugar, las HDL pueden iniciar cascadas de señalización de membrana que estimulan la

actividad de eNOS [176] y por último, las HDL regulan la abundancia de eNOS, por medio de cascadas de quinasas [177].

Proliferación, migración y apoptosis de células endoteliales

Desde los años 80 se han publicado estudios que demuestran que las HDL promocionan la proliferación de células endoteliales [178, 179] por un mecanismo regulado por calcio [180]. Además se ha visto que las HDL son capaces de promocionar la migración de células endoteliales de manera independiente a su proliferación. La migración es estimulada por la vía de señalización iniciada por SR-BI, y promueve la integridad de la monocapa endotelial *in vivo* [181]. Además se conoce que la apoptosis de células endoteliales contribuye a la patogenia de la aterosclerosis. Por lo tanto, otro de los efectos antiaterogénicos de la HDL sería su capacidad de inhibir la apoptosis de estas células, mediante la inhibición de cascadas pro-apoptóticas al unirse las HDL a la superficie de células endoteliales mediadas por receptores específicos [182, 183].

1.5. APOLIPOPROTEÍNA A-I

Como ya se ha descrito antes, la apolipoproteína A-I es la principal proteína de las partículas HDL. La proteína madura está formada por 243 aminoácidos (aa) y su peso molecular es de 28 kDa. Está formada por ocho repeticiones de hélices alfa de 11 y 22 aa de longitud, separadas por segmentos ricos en Prolinas [184, 185]. A lo largo de las hélices alfa, los residuos hidrofílicos se concentran en una cara y los hidrofóbicos en la contraria, confiriendo a la proteína un carácter anfipático, que le permite formar distintos tipos de interacciones con solventes y membranas. Esta estructura es fundamental para la formación y estabilización de la partícula de HDL en circulación.

1.5.1. Estructura de la apo A-I

Estructura primaria:

La apo A-I es sintetizada en el hígado e intestino en forma de una pre-pro-proteína no glicosilada [186] (Figura 9). El segmento pre- (de 18 aa) es un péptido señal eliminado antes de que la proteína sea secretada por la célula. El segmento pro- (de 6 aa) es eliminado después de la secreción por un mecanismo todavía no dilucidado. Se cree que puede existir una proteasa desconocida en el plasma encargada de la eliminación de estos 6 aa [187].

Figura 9. Estructura primaria de la apo A-I

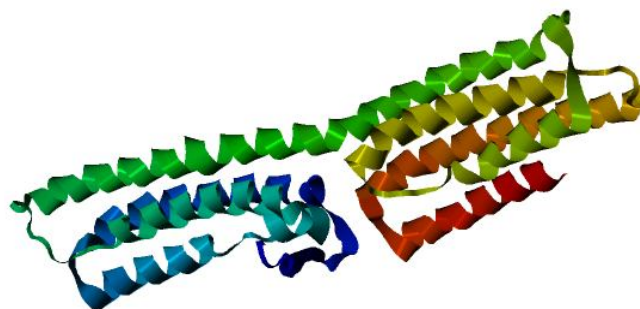


Representación esquemática de la estructura primaria de la apo A-I que incluye la pre-pro-proteína.

Estructura secundaria:

La apo A-I madura contiene ocho repeticiones en tandem de unidades de 22 aa, formando una α -hélice anfipática, que permite que la apo A-I desempeñe sus principales actividades biológicas [188] (Figura 10). Distintos estudios han revelado que la región N-terminal de la apo A-I juega un papel importante en la iniciación de la unión a lípidos y en la formación de partículas HDL nacientes [189]. La región central (residuos 144-186) es el dominio clave para la activación de la enzima LCAT [190, 191] y también es importante para la maduración y estabilidad de las HDL [192]. El dominio C-terminal (residuos 190-243) es crítico para la interacción de la apo A-I con los fosfolípidos [193, 194] y para promover el eflujo celular de colesterol [195, 196]. Además de las hélices se postula la existencia de una zona bisagra entre los residuos 130 y 174 que está implicada en la reorganización estructural que sufren las partículas de HDL al unirse a lípidos [197].

Figura 10. Estructura secundaria de la apo A-I

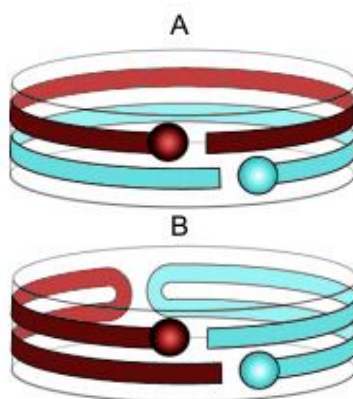


Estructura secundaria de la apo A-I libre de lípidos, obtenida de "The Protein Model Portal" (http://www.proteinmodelportal.org/?pid=modelDetail&pmpuid=1000004358278&range_from=1&range_to=267&ac=P02647&zid=async)

Estructura terciaria:

A pesar de los debates generados sobre los detalles de ciertas regiones de apo A-I cuando forma discos, la mayor parte de información teórica y experimental apoya el modelo de “doble cinturón” [101] (Figura 11). En este planteamiento, cada una de las moléculas en forma de anillo de apo A-I envuelve a una bicapa fosfolipídica en forma de disco, con una orientación anti-paralela (Figura 11. A). Aunque todavía hay discrepancias sobre la orientación exacta de las moléculas de apo A-I, pudiendo estar incluso formando una estructura de horquilla [198], como se muestra en la Figura 11. B.

Figura 11. Estructura terciaria de la apo A-I



Adaptado de Silva y col. “A Mass Spectrometric Determination of the Conformation of Dimeric Apolipoprotein A-I in Discoidal High Density Lipoproteins”. *Biochemistry*. 2005. Figura A: Orientación anti-paralela. Figura B: Orientación en horquilla.

1.5.2. Mutaciones y variantes de la apo A-I

En la actualidad se han descrito más de 60 variantes en el gen *APOA1*, de las cuales, al menos la mitad cursan con pérdida de función de la proteína, y están asociadas a concentraciones plasmáticas bajas de c-HDL (hipoalfalipoproteinemia) afectando negativamente el transporte reverso de colesterol, lo cual constituye un elevado riesgo para el desarrollo precoz de aterosclerosis [199-203]. Sin embargo existen casos paradójicos que, pese a estar asociados a concentraciones bajas de c-HDL, dan lugar a una ganancia de función y a un efecto cardioprotector. Uno de los casos mejor estudiados es el de la apo A-I Milano [204] aunque también existen otros con efectos parecidos como la apo A-I Paris [205]. La apo A-I Milano, que consiste en una sustitución de Arginina por Cisteína en la posición 173 (R173C) fue descrita por primera vez en 1980 en una familia de una población del norte de Italia, Limone sul Garda, cuyos portadores

presentaban un marcado déficit en los niveles plasmáticos de c-HDL pero una ausencia total de enfermedad vascular aterosclerótica. Estudios posteriores revelaron que esta mutación favorecía la unión de lípidos y que el catabolismo de las partículas HDL en estos individuos estaba acelerado, lo que explicaría su menor concentración en plasma pero una mayor eficacia en su función y la consiguiente disminución del riesgo de aterosclerosis.

En el año 2000 nuestro grupo descubrió otra mutación puntual en el gen *APOA1* que fue denominada apo A-I Zaragoza (apo A-I Z). La mutación está situada en el exón 4 del gen y da lugar al cambio de amino ácido Leucina por Arginina en posición 144 (L144R). Los portadores heterocigotos de esta mutación mostraban muy baja concentración de c-HDL, pero, de manera similar a lo que ocurre con la apo A-I Milano, no presentan evidencias de aterosclerosis subclínica. Estudios metabólicos en individuos portadores mostraron una velocidad de secreción ligeramente elevada y una velocidad de catabolismo que duplica la de la apo A-I normal [206], este hecho sugiere que el proceso de transporte reverso de colesterol puede verse favorecido por la variante apo A-I Z.

1.5.3. Posible utilidad farmacológica de la apo A-I Milano

Las propiedades beneficiosas de la apo A-I Milano han impulsado el desarrollo de moléculas sintéticas semejantes a ella, tanto la apo A-I Milano recombinante completa (MDCO-216), como péptidos miméticos que asemejan solo una parte de la molécula, con el fin de encontrar un uso farmacológico.

Estudios en animales demostraron que la administración de apo A-I Milano recombinante disminuía las lesiones ateroscleróticas y, en general, producía un beneficioso efecto antiaterogénico [207, 208]. Posteriormente también se llevaron a cabo estudios en humanos con resultados que indican que la apo A-I Milano es capaz de revertir la placa de ateroma [209, 210]. Estos trabajos constituyen la base para la utilización de la variante apo A-I Milano como tratamiento farmacológico en situaciones de enfermedad cardiovascular que está siendo desarrollado por distintas compañías.

Los estudios con péptidos miméticos también han tenido cierto éxito, como puede ser el ejemplo del compuesto D-4F, un péptido mimético que consiste 18 aa formando una hélice anfipática [211, 212].

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La variante de apo A-I, con la mutación L144R, denominada apo A-I Zaragoza, tiene un gran efecto ateroprotector que desempeña a través de un aumento de su capacidad de transporte reverso de colesterol. Al igual que se ha demostrado con la apo A-I Milano, la apo A-I Zaragoza puede utilizarse para el tratamiento de pacientes con aterosclerosis documentada y disminuir su riesgo de enfermedad coronaria.

OBJETIVOS

Principal:

Elucidar los mecanismos por los cuales la apo A-I Z ejerce sus efectos ateroprotectores con el fin de poder explorar las posibilidades de su utilización como fármaco para conseguir la regresión de la placa aterosclerosa en pacientes con riesgo de enfermedad coronaria.

Secundarios:

1. Expresar la proteína apo A-I Zaragoza en células procariotas.
2. Conseguir un máximo rendimiento en la producción de la proteína y optimizar la purificación de la misma.
3. Realizar una caracterización proteica completa de la apo A-I Zaragoza.
4. Evaluar la capacidad de la apo A-I Zaragoza para promover el eflujo de colesterol de las células de los tejidos periféricos.
5. Evaluar la capacidad de la apo A-I Zaragoza para promover la captación de colesterol por parte de las células hepáticas.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS

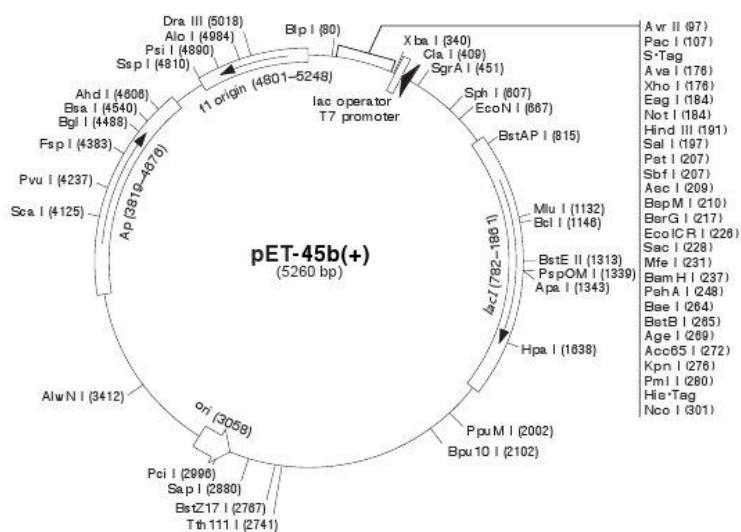
El material de partida para el desarrollo del proyecto fue un plásmido pUC18 con el cDNA de la apolipoproteína A-I humana cedido por la Dra. Delia Recalde (Unité d'Expression des Génès Eucaryotes, Instituto Pasteur, París). A partir de este cDNA se tenía que obtener únicamente la secuencia de la proteína madura para introducir en el plásmido de expresión pET-45 (Novagen).

El plásmido pET-45 es un plásmido apto para la expresión proteica caracterizado por:

- La posesión de un promotor T7 diseñado para controlar la inducción de la proteína a expresar.
- La capacidad de incorporar una cola de histidinas en el extremo amino terminal de la proteína producida, facilitando así su posterior purificación.
- Incluir un gen de resistencia de ampicilina que permite una selección positiva de bacterias transformadas.

La Figura 12 muestra la estructura del plásmido pET-45 y el mapa de restricción para enzimas con sitios de restricción únicos en la secuencia.

Figura 12. Plásmido pET-45



El hecho de que solo se pueda trabajar con la secuencia madura de la proteína es debido a que posteriormente la proteína se expresará en E.coli que es incapaz de realizar modificaciones post-traduccionales, como es la eliminación del segmento pre-pro- de la apo A-I.

3.1.1. Plásmido de expresión de apo A-I nativa

El objetivo fue obtener la secuencia de apo A-I nativa (apo A-I nat) madura clonada en el plásmido de expresión pET-45 para poder realizar su expresión posterior en E. coli. El constructo esperado está representado en la Figura 13.

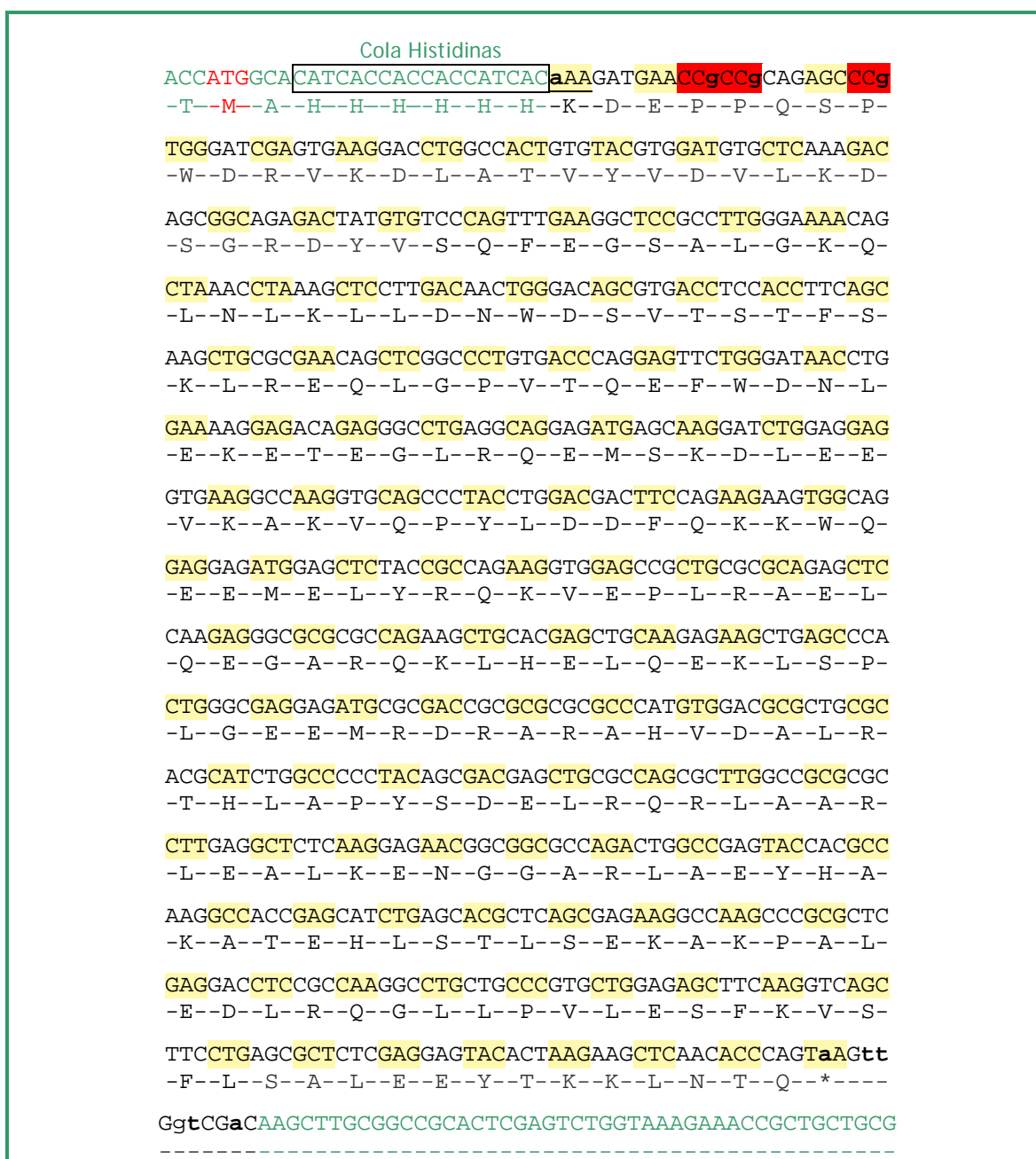
3.1.1.1. Amplificación por PCR

Para la construcción del plásmido de expresión con la secuencia codificante de la apo A-I nat madura se introdujeron tres sitios de restricción en la secuencia codificante, uno en el extremo 5' (Dra I) y dos en el extremo 3' (Sal I y Bst XI) mediante la realización de una amplificación por PCR utilizando cebadores especialmente diseñados.

Para introducir el fragmento en el plásmido de expresión elegido (pET-45) se utilizaron los sitios de restricción de las enzimas Dra I y Sal I. Sin embargo, en pET-45 no existe sitio de Dra I, pero sí existe un sitio para la enzima Pml I. Ambas enzimas generan extremos romos al actuar permitiendo así incorporar el fragmento.

Al diseñar los cebadores también se modificaron tres codones de la proteína por otros que codifican el mismo aminoácido pero que corresponden a tRNAs mejor representados en E.coli con el fin de mejorar el rendimiento de la expresión de la proteína. (Codones marcados en rojo en la Figura 13).

Figura 13. Secuencia de apo A-I incluida en pET-45



Secuencia madura de la apo A-I nat introducida en el plásmido pET-45. Los fragmentos de pET-45 están marcados en verde. Las mutaciones incorporadas se indican con caracteres en minúsculas y negrita. Los codones marcados en rojo se modificaron para mejorar el rendimiento de la producción proteica.

Los cebadores fueron analizados con el programa *Oligoanalyzer 3.1* (<http://www.idtdna.eu/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>) para obtener la temperatura de hibridación de cada cebador, y analizar la posibilidad de formación de homodímeros y heterodímeros. La Tabla 1 muestra las secuencias de los cebadores empleados.

Tabla 1. Secuencias de cebadores para la construcción del plásmido de expresión de la apo A-I nat.

Nombre	Secuencia	pb
Cebador 1	5'-CGGCATTTCTGGTTTAAAGATGAACCGCCGAGAGCCCGTGG-3'	42
Cebador 2	5'-GAGAGGCGTCGACCAACTTACTGGGTGTTGAGCTTCTTAGTG-3'	42

La amplificación por PCR se realizó en un volumen de 50 μ l utilizando el programa térmico indicado en la Figura 14. Las cantidades y concentraciones finales de componentes en la mezcla de reacción se muestran en la Tabla 2.

Con el fin de minimizar los errores durante la amplificación se utilizó la enzima Pwo SuperYield DNA Polimerasa (Roche), cuya fidelidad es 1000 veces superior a la Taq DNA Polimerasa, y una estrategia de PCR "Touchdown" para aumentar la especificidad de la amplificación.

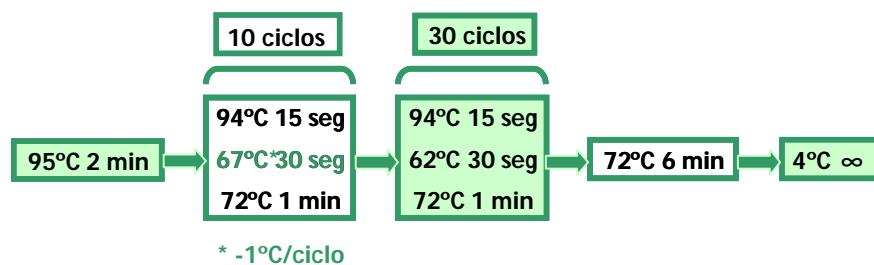
Para las amplificaciones por PCR se empleó un termociclador GeneAmp PCR System 9700 de Applied Biosystems.

El resultado de la amplificación se comprobó mediante electroforesis a 90V durante 30min en un gel convencional de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio.

Tabla 2. Cantidades y concentraciones de los reactivos utilizados en la reacción de PCR.

Reactivo	Cantidad (μ l)	Concentración final
dH ₂ O	34.5 μ l	
10X tampón	5 μ l	1x
2.5mM dNTPs	4 μ l	200 μ M
30 μ M Cebador 1	0.5 μ l	300nM
30 μ M Cebador 2	0.5 μ l	300nM
5U/ μ l Pwo SY	0.5 μ l	0.05U/ μ l
pUC18+cDNA Apo A-I	5 μ l	

Figura 14. Programa de PCR tipo Touchdown



3.1.1.2. Clonaje en pET-45

Una vez obtenido el fragmento amplificado por PCR, se procedió a su clonaje en el plásmido de expresión pET-45 utilizando enzimas de restricción.

3.1.1.2.1. Digestión con enzimas de restricción

Para ello se utilizaron dos enzimas que requerían dos tampones distintos, haciendo necesaria una etapa intermedia de precipitación de DNA para poder cambiar el tampón.

En la primera etapa se realizó una digestión utilizando 10U de la enzima Sal I (Fermentas). Las digestiones se llevaron cabo durante 3 horas a 37°C utilizando la mezcla de reactivos mostrado en la Tabla 3.

Tabla 3. Reactivos empleados en la digestión de los apo A-I nat y pET-45.

Reactivo	Cantidad (µl) apo A-I nat	Cantidad (µl) plásmido pET-45
DNA plasmídico	20µl	1.5µl
Tampón de Sal I 10x	5µl	2µl
Sal I	1.5µl	1µl
dH ₂ O	23.5µl	15.5µl
VOLUMEN FINAL	50µl	20µl

Tras esta primera digestión se realizó una precipitación de DNA con etanol para llevar a cabo el cambio del tampón. Para ello se añadió el doble de volumen de etanol absoluto a cada muestra y se dejó a -20°C durante toda la noche. A continuación se centrifugaron las muestras a 13.200 r.p.m. a 1°C durante 30 min en una microcentrífuga 5415R (Eppendorf). Se eliminó el sobrenadante y se lavó el DNA precipitado con 300µl de etanol 70%. Tras la centrifugación a 13.200 r.p.m. a 4°C durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y se dejaron secar completamente en una baño seco a 37°C. Finalmente se llevó a cabo la segunda digestión en todas las muestras.

A cada muestra se añadieron 10U de enzima, en caso de pET-45 Eco72I (Fermentas), un isosquizómero de Pml I y en los demás Dra I (Fermentas). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 20 μ l, durante 3 horas a 37°C.

3.1.1.2.2. Purificación de DNA mediante electroforesis en gel de agarosa

La purificación de los fragmentos obtenidos mediante amplificación por PCR y de la digestión del plásmido se realizó utilizando el kit comercial "*Centrifuge DNA Extraction Kit*" de Nedken siguiendo el protocolo del fabricante. Primero, se recortaron las bandas de interés del gel visualizándolas en transiluminador UV y se pesaron. Se añadieron 500 μ l de tampón solubilizador por cada 150mg de agarosa. Se incubó a 50°C bajo agitación continua durante 10 minutos en un Thermomixer Compact (Eppendorf). A continuación se resuspendió en 250 μ l de tampón de unión y se cargó 800 μ l en una columna suministrada por el fabricante. Se centrifugó a 12.000 r.p.m. en una microcentrífuga Spectrafuge 16M (Labnet) durante 1 minuto, desechando el filtrado. La columna se lavó con 500 μ l de tampón de lavado y se centrifugó a 12.000 r.p.m durante 30 segundos, repitiéndose el proceso 2 veces. Para garantizar la eliminación completa del etanol residual se centrifugó la columna durante 4 minutos a 14.000 r.p.m. Finalmente, el producto fue eluido añadiendo 25 μ l de tampón de elución.

3.1.1.2.3. Defosforilación del vector

Para evitar la recircularización del plásmido sin incluir el inserto durante la ligación, se sometió el plásmido digerido a una defosforilación que elimina los fosfatos terminales del plásmidos abierto generado tras la digestión.

La defosforilación se llevo a cabo con 23 μ l de pET-45 purificado, 3 μ l de tampón de la fosfatasa y 4.6 μ l de la enzima fosfatasa Antarctic (New England BioLabs) con una temperatura de incubación de 37°C durante 1 hora seguido de 5 min a 65°C para conseguir la inactivación de la enzima fosfatasa.

Una vez realizada la defosforilación, se pasó a la reacción de ligación.

3.1.1.2.4. Ligación

La reacción de ligación se llevó cabo con los reactivos mostrados en la Tabla 4. Además se preparó un control de ligación sin inserto sustituyendo los 12 μ l de inserto por el mismo volumen de dH₂O. La reacción se realizó a 16°C durante 16 horas.

Tabla 4. Reactivos de la reacción de ligación

Reactivo	Cantidad (μ l)
pET-45 desfosforilado	4 μ l
Inserto	12 μ l
Tampón de la T4 Ligasa	2 μ l
T4 Ligasa	1 μ l
dH ₂ O	1 μ l

3.1.1.2.5. Transformación de E.coli NovaBlue

La transformación de bacterias competentes comerciales de la cepa de E.coli NovaBlue (Novagen) se llevo a cabo mediante choque térmico. Se añadió 1 μ l de producto de ligación o plásmido control a las E.coli NovaBlue descongeladas previamente en hielo (50 μ l) con agitación suave. Se incubaron en hielo durante 5 min, seguido de 30 segundos en un baño de 42°C y de nuevo 2 min en hielo. Se añadieron 250 μ l de medio SOC a cada muestra y se incubaron con agitación a 37°C durante 30 minutos. Pasado este tiempo se sembraron 50 μ l de muestra en las placas de LB-Agar/Ampicilina (100 μ g/ml) y se incubaron en estufa a 37°C durante toda la noche.

3.1.1.2.6. Detección de colonias positivas mediante PCR

Para comprobar que colonias resistentes a ampicilina realmente tenían el inserto en el plásmido incorporado, se realizó una PCR de colonias.

Se realizaron cultivos a pequeña escala (4ml) de colonias aparecidas en agar/ampicilina y se comprobó mediante amplificación por PCR la presencia del inserto de tamaño deseado.

Se diseñaron cebadores que se hibridan específicamente al plásmido pET-45 flanqueando el sitio de clonaje múltiple donde se había introducido el inserto (Tabla 5).

Tabla 5. Secuencia de cebadores empleados en la PCR de colonias

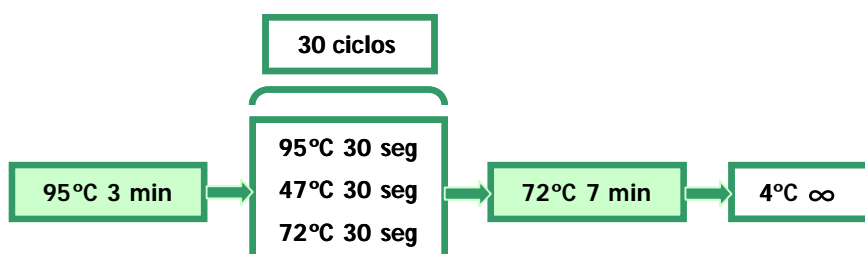
Nombre	Secuencia	pb
pET-45 F	5'- TAATACGACTCACTATAGGG -3'	20
pET-45 R	5'- GTCCATGTGCTGGCGTTC-3'	18

Se realizó amplificación por PCR utilizando los reactivos indicados en la Tabla 6 y el programa térmico de la Figura 15.

Tabla 6. Cantidades y concentraciones de los reactivos utilizados en la reacción de PCR.

Reactivo	Cantidad (μl)	Concentración final
dH ₂ O	17.6 μl	
10X tampón	2.5 μl	1x
50 mM MgCl ₂	0.75 μl	1.5mM
2.5mM dNTPs	2 μl	200 μM
30 μM pET-45 F	0.5 μl	600nM
30 μM pET-45 R	0.5 μl	600nM
5U/ μl Taq DNA Polimerasa	0.15 μl	0.03U/ μl
Cultivo	1 μl	

Figura 15. Programa de PCR de colonias



El resultado de la amplificación se comprobó por electroforesis a 90V durante 30min en un gel convencional de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio. La presencia de una amplificación de 800 pares de bases (pb) de tamaño indicó un resultado positivo.

Se obtuvo DNA plasmídico de aquellos cultivos que dieron un resultado positivo en la electroforesis en gel de agarosa.

3.1.1.2.7. Obtención de DNA plasmídico

El DNA plasmídico se obtuvo utilizando el kit de *Nedken* "Centrifuge Plasmid Mini Kit" siguiendo el protocolo del fabricante. Brevemente, primero se decantaron 2ml de cultivo de *E.coli* y se centrifugaron durante 1 minuto a 14.000 r.p.m. en una microcentrífuga Spectrafuge 16M (Labnet) eliminándose el sobrenadante. Se resuspendió el *pellet* en 250 μl de Solución A y 250 μl de Solución B y se mezcló suavemente. A continuación se añadieron 250 μl de Solución C, mezclando suavemente y se centrifugaron a 14.000 r.p.m. durante 5 minutos. Se decantó el sobrenadante sobre los filtros introducidos en tubos recipientes de 2ml y se incubó 1 minuto a temperatura

ambiente. Seguidamente se centrifugó 1 minuto a 10.000 r.p.m. desechando el filtrado. A continuación se añadieron 750µl de solución de lavado y se centrifugó durante 1 minuto a 10.000 r.p.m. y se desechó el filtrado. Finalmente se centrifugaron 3 minutos a 14.000 r.p.m. para eliminar completamente los residuos de etanol. Se introdujeron los filtros en tubos recipiente de 1.5ml y se eluyó el producto final en 100µl de solución de elución (tampón TE 1x).

3.1.1.2.8. Cuantificación espectrofotométrica de la concentración de DNA plasmídico

Previo a la secuenciación del DNA plasmídico es necesario su cuantificación.

Los ácidos nucleicos, debido a su estructura molecular, absorben la radiación en el rango del ultravioleta, con un máximo a una longitud de onda (λ) de 260nm. Para las proteínas, sin embargo, el máximo de absorción se produce a una longitud de onda de 280nm. Así se determinó la concentración de DNA a partir de las absorbancias medidas en un espectrofotómetro GeneQuant II RNA/DNA Calculator (Pharmacia Biotech) a 260nm. La medida de la pureza de la muestra de DNA se determinó mediante el cociente entre la absorbancia (A) medida a 260nm y la obtenida a 280nm. Se consideró que los valores óptimos de pureza eran los comprendidos entre 1,8-2,0 para la relación A260/A280.

Las medidas se llevaron a cabo en una cubeta de cuarzo de 10mm de paso de luz en la que se introdujeron 300µl de tampón TE 1x y 3µl de muestra. La concentración se obtuvo teniendo en cuenta que una unidad de densidad óptica (DO) de A260 corresponde a 50µg/ml de DNA de doble cadena.

3.1.1.3. Verificación mediante Secuenciación

Para realizar la secuenciación se empleó el kit de secuenciación de Amersham Pharmacia General Electric y el sistema MEGABACE del Servicio de Secuenciación de la Universidad de Zaragoza.

El kit de secuenciación está basado en la modificación del método enzimático de Sanger, empleando didesoxinucleótidos que están marcados con fluoróforos para una detección automatizada. En este kit, cada uno de los cuatro didesoxinucleótidos está marcado con dos sustancias, fluoresceína y rodamina.

Para la secuenciación se utilizaron los cebadores mostrados en la Tabla 5.

Para el alineamiento y análisis de las secuencias se empleó el programa *BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.9*.

Finalmente, se realizó una congelación en glicerol al 15% de los cultivos que habían dado un resultado positivo en la secuenciación.

Bajo condiciones de esterilidad se añadieron 850µl de cultivo a 150µl de glicerol en tubos de 2ml previamente autoclavados. Se mezclaron con un agitador e inmediatamente se realizó la congelación en nitrógeno líquido durante 5 segundos. Posteriormente se almacenaron a -80°C.

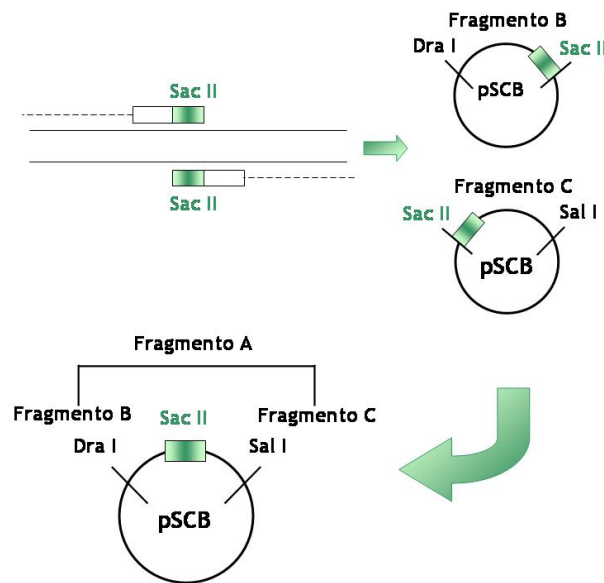
3.1.2. Construcción del Plásmido de expresión de la apo A-I Zaragoza

3.1.2.1. Mutagénesis dirigida: Amplificación por PCR

El sistema de mutagénesis empleado para la construcción de la apo A-I Z se basó en la generación de dos fragmentos solapantes incluyendo la mutación con un sitio de restricción único que permitió la reconstitución de la secuencia completa con la mutación tras clonaje por separado de cada fragmento en un vector común (Figura 16)[213].

Se diseñaron dos cebadores que hibridaban sobre la zona donde se sitúa la mutación que combinados con los cebadores descritos en el apartado 3.1.1.1 (página 38) permitieron la realización de dos amplificaciones (Fragmento B y Fragmento C) que se solapaban e incluían la mutación.

Figura 16. Sistema de mutagénesis para la generación de apo A-I Z.



En el diseño de los cebadores internos mutagénicos se incorporó el sitio de restricción SacII solapando la mutación de la apo A-I Z. Esta modificación de la secuencia posibilitó la ligación posterior de los Fragmentos B y C para dar lugar al Fragmento A, que es la secuencia de la apo A-I madura con la mutación L144R incorporada.

En la Tabla 7 se muestran las secuencias de los cebadores empleados.

Tabla 7. Secuencias de cebadores para la construcción de del plásmido de apo A-I Z.

Nombre	Secuencia	pb
Cebador 1	5'-CGGCATTTCTGGTTTAAAGATGAACCGCCGAGCCCGTGG-3'	42
Cebador 2	5'-GAGAGGCGTCGACCAACTTACTGGGTGTTGAGCTTCTTAGTG-3'	42
Cebador 3	5'-CGCATCTCCTCGCCGCGGGGGCTCAGCTTC-3'	30
Cebador 4	5'-GAAGCTGAGCCCCGCGGAGGAGATGCGCG-3'	32

Para obtener los nuevos fragmentos se usaron los mismos reactivos que en la Tabla 2 con la excepción de los cebadores. En el caso del fragmento B se emplearon 30µM de Cebador 1 y 30µM de Cebador 3 y en el caso del fragmento C se emplearon 30µM de Cebador 4 y 30µM de Cebador 2. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) y con el programa térmico mostrado en la Figura 14.

Los productos de la PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1% y teñido con bromuro de etidio.

3.1.2.1.1. Purificación de DNA de agarosa

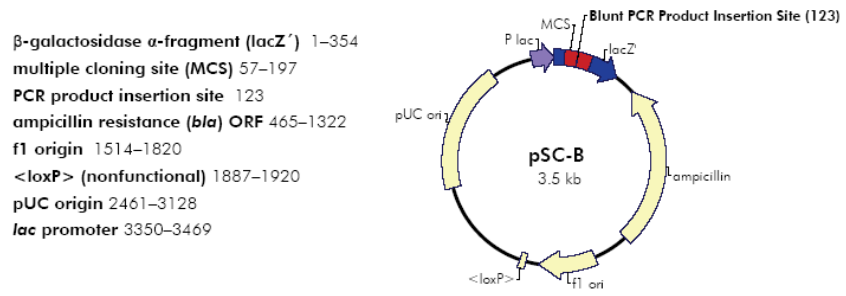
La purificación de los fragmentos amplificados se realizó de la misma forma que se ha descrito en el apartado 3.1.1.2.2 (página 40).

3.1.2.2. Subclonaje en pSCB

El kit comercial "*Blunt PCR Cloning Kit*" de Stratagen permite el clonaje de fragmentos de PCR con extremos romos, utilizando la actividad de la topoisomerasa I del virus Vaccinia y la actividad de la Cre recombinasa del bacteriofago P1. Gracias a la actividad de la topoisomerasa que permite la relajación de las hebras de DNA, corte y posterior unión, se hace innecesaria la presencia de una ligasa convencional. La recombinasa Cre, expresada en la cepa de E.coli utilizada en este procedimiento, posibilita una estrategia que aumenta el rendimiento de obtención de clones con el inserto introducido (Figura 17 y 18).

Tras la purificación de los fragmentos B y C, se subclonaron por separado en el vector pSCB generando los vectores M1 (pSCB+fragmento B) y M2 (pSCB+fragmento C) siguiendo las indicaciones del fabricante. Primero, se añadieron a cada tubo 3µl del tampón "*Blunt Cloning*", 2µl de producto de PCR y 1µl de "*Blunt Vector mix*". Se agitó suavemente y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min, enfriando a continuación a hielo. Se utilizó 1µl de esta mezcla para transformar células E.coli XL-1 competentes que expresan la recombinasa Cre, previamente descongeladas, agitando suavemente. Se incubaron 20 min en hielo y tras esta incubación se realizó un choque térmico, introduciendo las células en un baño de 42°C durante 45 seg y pasándolas directamente después a hielo donde se mantuvieron 2 min. A continuación se añadieron 250µl de SOC (Bacto Triptona 20g/L, extracto de levadura 5g/L, NaCl 0.1M, KCl 2mM, MgSO₄·7H₂O 10mM, MgCl₂·6H₂O 10mM, Glucosa 20mM) e incubando con agitación durante 1 hora a 37°C el tubo en posición horizontal para favorecer la aireación. Tras la incubación se sembraron las placas a 2 concentraciones: una con 5µl y otra con 100µl además de una placa control con 30µl de pUC18. Las placas se dejaron incubando toda la noche a 37°C. Tras 18 horas de incubación se prepararon cultivos de colonias individuales en 4ml de LB con ampicilina (100µg/ml). Los cultivos se dejaron agitando a 37°C durante toda la noche.

Figura 17. Plásmido pSCB



pSC-B Blunt PCR Cloning Vector PCR Product Insertion Site Region
(sequence shown 3460–3469, 1–252)

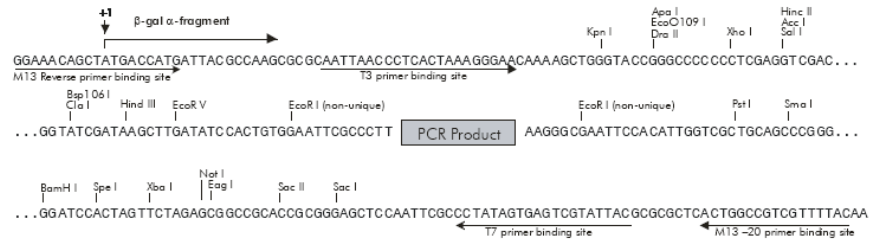
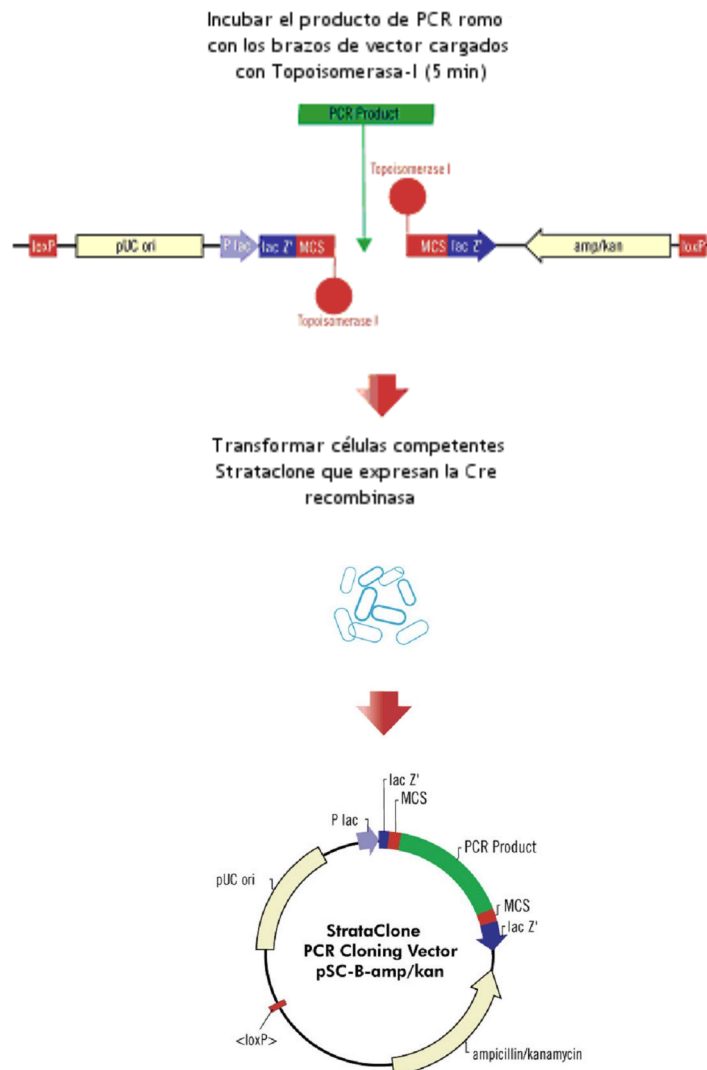


Figura 18. Esquema del método del clonaje utilizado



3.1.2.2.1. Detección de colonias positivas mediante PCR

Para comprobar que colonias resistentes a ampicilina realmente tenían el inserto en el plásmido incorporado, se realizó una PCR de colonias.

Se diseñaron cebadores que se unían específicamente al plásmido en posiciones 5' y 3' flanqueando el inserto, pudiéndose usar los mismos cebadores tanto para el fragmento B como el fragmento C. (Tabla 8)

Tabla 8. Secuencia de cebadores empleados en la PCR de colonias

Nombre	Secuencia	pb
pSCB F	5'-AATTAACCCTCACTAAAGGGAA-3'	32
pSCB R	5'-GTAATACGACTCACTATAGG-3'	20

Se realizó amplificación por PCR utilizando los reactivos indicados en la Tabla 6, con la excepción de los cebadores que se usaron los de la Tabla 8 y el programa térmico de la Figura 15.

El resultado de la amplificación se comprobó por electroforesis a 90V durante 30min en un gel convencional de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio.

Se obtuvo DNA plasmídico de aquellos cultivos que dieron un resultado positivo en la electroforesis en gel de agarosa.

3.1.2.2.2. Obtención de DNA plasmídico

El DNA plasmídico se realizó de la misma forma que se ha descrito en el apartado 3.1.1.2.7 (página 42).

3.1.2.2.3. Cuantificación espectrofotométrica

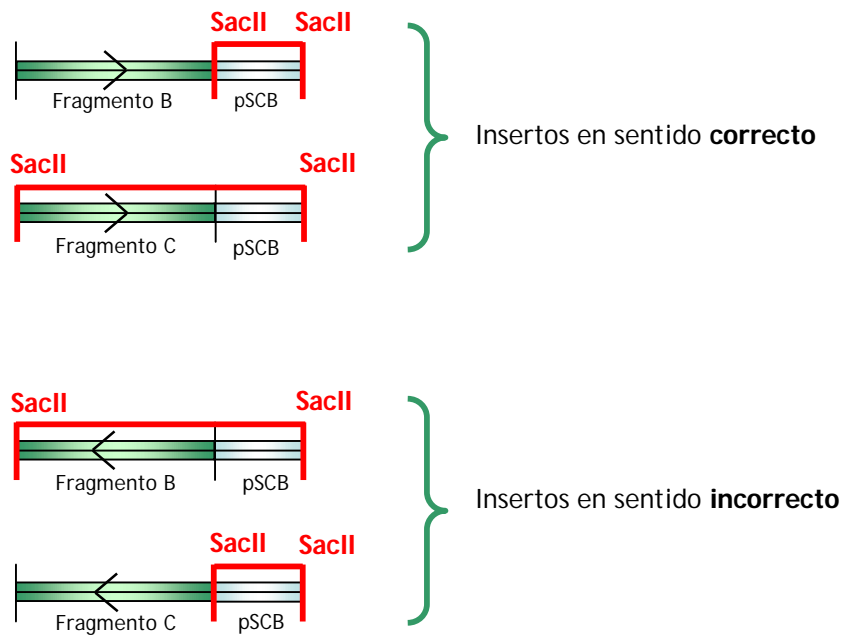
Previo a la secuenciación del DNA plasmídico es necesario su cuantificación, que se realizó del mismo modo que se ha explicado en el apartado apartado 3.1.1.2.8 (página 43).

3.1.2.2.4. Verificación del sentido del inserto

El clonaje de productos de PCR introduce el fragmento de DNA aleatoriamente en cualquiera de los dos sentidos. Para las etapas posteriores de fusión de los fragmentos B y C era necesario utilizar aquellos plásmidos con el inserto en la orientación correcta. La presencia de un sitio SacII en el vector y otro en un extremo del inserto permite un análisis de restricción con SacII para determinar la orientación del inserto en los plásmidos obtenidos según el esquema indicado en la Figura 19.

Los reactivos empleados se muestran en la Tabla 9. Las digestiones se incubaron a 37°C durante 3 horas y el resultado se comprobó por electroforesis a 90V durante 1h 30min en un gel convencional de agarosa al 1% en tampón TAE 1X teñido con bromuro de etidio.

Figura 19. Posibles formas de inserción de los fragmentos B y C en el vector pSCB.



Los fragmentos obtenidos por la digestión con SacII se indican por líneas rojas.

Tabla 9. Reactivos empleados en la digestión de los plásmidos M1 y M2

Reactivo	Cantidad (µl) plásmido M1	Cantidad (µl) plásmido M2
DNA plasmídico	15µl	25µl
Tampón de SacII 10x	4µl	5µl
SacII 10U/µl	2µl	2µl
dH ₂ O	19µl	18µl
VOLUMEN FINAL	40µl	50µl

3.1.2.2.5. Verificación mediante Secuenciación

Para aquellos plásmidos con los fragmentos B ó C en una orientación correcta se verificó que la secuencia de nucleótidos era la esperada mediante secuenciación de DNA, tanto en sentido directo como reverso, con los cebadores pSCB F y pSCB R (Tabla 8). El método utilizado fue el explicado en el apartado apartado 3.1.1.3. (páginas 43-44).

Para el alineamiento y análisis de las secuencias se empleó el programa *BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.9*.

Se guardaron "stocks" congelados de los cultivos que habían dado un resultado positivo en la secuenciación de la misma forma descrita en el apartado 3.1.1.3. (página 44).

3.1.2.2.6. Construcción del Fragmento A

Para generar el Fragmento A, consistente en la secuencia de la apo A-I madura incluyendo la mutación L144R, se unieron los Fragmentos B y C introducidos previamente en pSCB. Para ellos se obtuvo mediante digestión con SacII el Fragmento C y se introdujo en el sitio correspondiente del plásmido M1.

Los reactivos utilizados para la digestión quedan reflejados en la Tabla 9 del apartado 3.1.2.2.4 (página 50). Las digestiones se realizaron a 37°C durante 3 horas y el resultado se comprobó por electroforesis a 90V durante 1h 30min en un gel convencional de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio.

3.1.2.2.7. Desfosforilación del vector

La defosforilación se llevó a cabo con 5µl del plásmido M1 digerido con SacII, 1µl de la enzima fosfatasa Antarctic (New England BioLabs) y 0.6µl de tampón de la fosfatasa, con una temperatura de incubación de 37°C durante 1 hora seguida de 5 min a 65°C para conseguir la inactivación enzimática.

Una vez realizada la desfosforilación, se pasó a la reacción de ligación.

3.1.2.2.8. Ligación

La reacción de ligación se llevó cabo con los reactivos mostrados en la Tabla 10. Además se preparó un control de ligación sin inserto sustituyendo los 3µl de inserto por 3µl de dH₂O. La reacción de ligación se realizó a 16°C durante 16 horas.

Tabla 10. Reactivos de la reacción de ligación

Reactivo	Cantidad (µl)
Producto de defosforilación	2.6µl
Inserto (pSCB+C digerido con Sac II)	3µl
Tampón de la T4 Ligasa	2µl
T4 Ligasa	1µl
dH ₂ O	11.4µl

3.1.2.2.9. Transformación de E.coli NovaBlue

La transformación en E.coli NovaBlue se realizó del mismo modo que se ha descrito en el apartado 3.1.1.2.5 en la página 41.

3.1.2.3. Clonaje en el plásmido de expresión pET-45

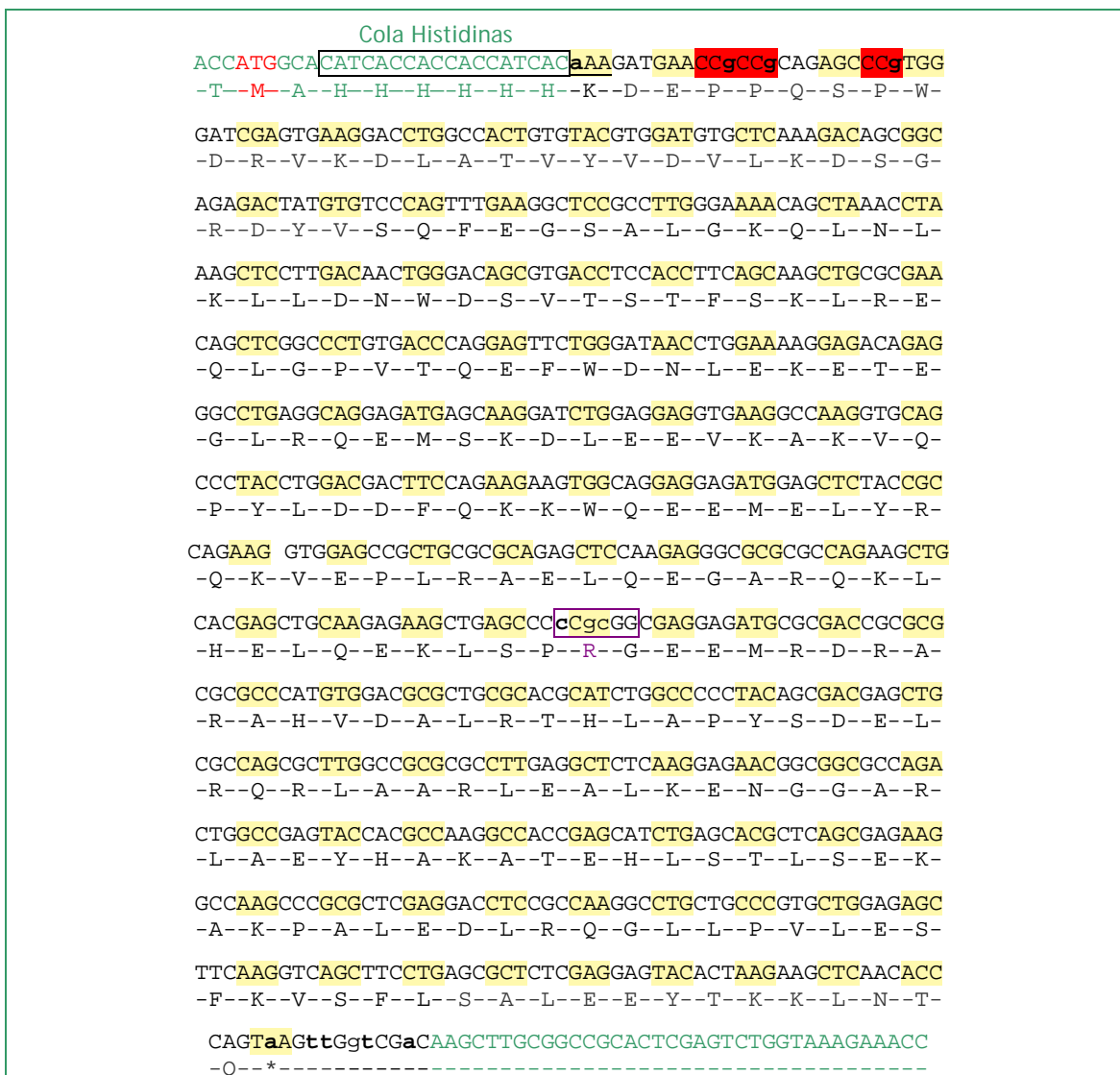
Se realizó el clonaje del Fragmento A en el plásmido pET-45 del mismo modo que se realizó para la apo A-I nat. La secuencia resultante se muestra en la Figura 20.

Se realizaron los mismos pasos que se detallan en el apartado 3.1.1.2 (páginas 39-43). Las cantidades que se utilizaron para la digestión inicial se muestran en la Tabla 11. Las cantidades de la segunda digestión son las mismas descritas en el apartado 3.1.1.2.1 (páginas 39-40).

Tabla 11. Reactivos empleados en la primera digestión del plásmido Apo A-I Z y pET-45.

Reactivo	Cantidad (μ l) plásmido Apo A-I Z	Cantidad (μ l) plásmido pET-45
DNA plasmídico	5 μ l	1.5 μ l
Tampón de Sal I 10x	3 μ l	2 μ l
Sal I	1.5 μ l	1 μ l
dH ₂ O	20.5 μ l	15.5 μ l
VOLUMEN FINAL	30μl	20μl

Figura 20. Secuencia de apo A-I Z incluida en pET-45



Secuencia madura de la apo A-I Z introducida en el plásmido pET-45. Los fragmentos de pET-45 están marcadas en verde. Las mutaciones incorporadas se indican con caracteres en minúsculas y negrita. Los codones marcados en rojo se modificaron para mejorar el rendimiento de la producción proteica. En morado se muestra el sitio de Sac II introducido y la mutación correspondiente a la apo A-I Z.

3.1.2.4. Secuenciación

La secuenciación de las muestras se realizó de igual forma que en el apartado 3.1.1.3. (página 43) utilizando los cebadores mostrados en la Tabla 5.

3.2. EXPRESIÓN PROTEÍCA Y PURIFICACIÓN

3.2.1. Expresión e Inducción

3.2.1.1. Preparación de células competentes BL21(DE3)

La cepa BL21(DE3) de E.coli es adecuada para la sobreexpresión heteróloga de proteínas. Esta cepa carece de las proteasas Lon y Ompt que degradan el exceso de proteína producido, y por lo tanto favorece la sobreexpresión y acumulo de proteína.

El proceso denominado hacer competentes a las células consiste en desestabilizar la membrana de las bacterias, dejándola en un estado semiporoso que favorece la transformación de las mismas al introducir los plásmidos.

Para llevar a cabo este proceso se partió de una alícuota de bacterias E.coli BL21(DE3) almacenada a -80°C. Las células se sembraron en un tubo de 4ml de medio de cultivo LB estéril sin ampicilina y se incubaron en agitación a 180 r.p.m. con un agitador orbital a una temperatura de 37°C durante toda la noche. A la mañana siguiente se inocularon 100ml de medio LB estéril sin ampicilina con 500µl del precultivo y se dejó a 37°C con agitación de 180 r.p.m. hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6-0.7 medida a 595nm. Una vez obtenido el valor de densidad óptica óptima se mantuvo el cultivo en hielo durante 15 min, y después se centrifugó durante 15 min a 4°C y 3.000 r.p.m. en una centrífuga 3-16K Sartorius (Sigma). Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el "pellet" de bacterias en 16.5ml de solución RF 1 (100mM RbCl, 50mM MnCl₂, 30mM acetato de potasio, 10mM CaCl₂, 15% glicerol, ajustado a pH 5.8) previamente enfriada, asegurando una completa dispersión. Se volvió a incubar en hielo durante 15 min y después se centrifugó 15 min a 4°C y 3.000 r.p.m.. Se eliminó el sobrenadante de nuevo y se añadieron 4ml de solución RF 2 (10 mM MOPS pH 6.8, 10mM RbCl, 75mM CaCl₂, 15% glicerol, ajustado a pH 6.8) previamente enfriada y finalmente, se resuspendió el "pellet" con cuidado. Se prepararon alícuotas de 200µl y 400µl en tubos de 2ml esterilizados y se almacenaron en un congelador a -80°C.

3.2.1.2. Transformación en células competentes BL21(DE3)

La transformación de bacterias competentes E.coli BL21(DE3) se realizó mediante choque térmico. Se añadió 1µl de plásmido pET-45+Apo A-I nat o pET-45+Apo A-I Z diluido 1:1000 a 50µl de células BL21(DE3) descongeladas previamente en hielo. Se incubaron en hielo durante 20 minutos, seguido de 30 segundos en un baño de 42°C y de nuevo 5 minutos en hielo. Se añadieron 450µl de SOC precalentado a cada muestra y se incubaron a 37°C y agitando a 180 r.p.m. durante 30 minutos. Pasado este tiempo se

sembraron 100µl de muestra en placas de LB-Agar/Ampicilina(100µg/ml) y se incubaron en la estufa a 37°C durante toda la noche. Se guardaron "stocks" congelados de la misma forma que el apartado 3.1.1.3 (página 44).

3.2.1.3. Inducción de la expresión proteica

En una etapa inicial se realizaron pruebas de inducción de expresión proteica a pequeña escala (cultivos de 100ml) para optimizar el tiempo de inducción. Una vez conseguido la optimización se realizó una expresión proteica a mayor escala, utilizando cultivos de 1 litro para obtener mayor cantidad de proteína.

La inducción de la expresión se realizó con isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG) a una concentración final de 1mmol/L cultivo cuando la densidad óptica del cultivo fue superior a 0.4. El nivel de expresión de las proteínas de interés en extractos totales de cultivos inducidos durante diferentes periodos de tiempo fue evaluado mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS y tinción con Coomassie como se describe posteriormente y resultó ser óptimo a los 120 minutos.

3.2.2. Purificación

3.2.2.1. Purificación mediante cromatografía de afinidad en columnas de níquel

La purificación de apo A-I nat y apo A-I Z se llevo a cabo utilizando un protocolo no desnaturizante mediante cromatografía de afinidad en columnas de níquel.

Se centrifugaron los cultivos durante 10 minutos a 4°C y 5.400 r.p.m., y después se resuspendió el "pellet" en solución de lisis (LEW tampón 1X (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, pH 8.0) + 1mg/ml Lisozima + *cOmplete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Tablets* (Roche)).

Se sonicaron las suspensiones en un sonicador Sonoplus HD 2200 (Bandelin) en 10 tandas de 15seg con tiempos de reposo intermedios de 30seg. A continuación se centrifugaron a 13.200 r.p.m. a 4°C durante 30min. El sobrenadante se cargó en columnas Protino Ni-TED (Macherey-Nagel) capaces de fijar por afinidad proteínas con cola de histidina. La purificación se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, tras su paso por la matriz y dos lavados con tampón LEW 1X (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, pH 8.0), las proteínas retenidas en la columna se eluyeron con el tampón de elución (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 250 mM imidazol, pH 8.0).

3.2.2.2. Diálisis y Concentración

Las proteínas eluidas de la columna se dializaron extensivamente frente a tampón fosfato salino (PBS) y se concentraron utilizando filtros Amicon® Ultra (Millipore).

3.2.2.3. Electroforesis en PAGE-SDS

Se realizó electroforesis desnaturalizantes para visualizar el nivel de expresión de las proteínas inducido por IPTG y para evaluar el resultado de la purificación por cromatografía de afinidad. La electroforesis se realizó siguiendo el método descrito por Laemmli [214], en geles de poliacrilamida y condiciones reductoras. En todos los casos se hicieron geles discontinuos de 0.75mm de espesor y 7cm de ancho y un porcentaje de acrilamida del 15%. La relación acrilamida/bisacrilamida comercial (Bio-Rad) fue de 37.5:1.. Los tampones utilizados se prepararon con regularidad y se filtraron antes de cada uso. El marcador de pesos moleculares utilizado fue Protein Marker, Broad Range (New England BioLabs) con un rango de pesos moleculares de 2-212kDa del cual se añadieron 7µL por pocillo. Como tampón desnaturalizante se utilizó el tampón de tratamiento de muestra comercial Tris-Glycine SDS Sample Buffer 2X (Invitrogen) el cuál se mezcló con las muestras a partes iguales. Las proteínas se desnaturalizaron calentándolas a 99°C durante 5 minutos y se aplicaron en los pocillos sumergidos en el tampón de electroforesis TGS 1X (Bio-Rad). El equipo usado fue el Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System (Bio-Rad) con una fuente electroforética Power Pac 1000 (Bio-Rad). Las condiciones de electroforesis habituales fueron las siguientes: 30 min a 50 V, 1 hora 30 minutos a 100 V, temperatura ambiente, o hasta que el frente de la electroforesis llegase al final del gel. Posteriormente, se tiñeron los geles con Bio-Safe Coomassie de Bio-Rad durante 1 hora y se lavaron con dH₂O hasta que el fondo del gel estaba lo suficientemente claro. Para visualizar los geles se escanearon en un Scanner HP scanjet 3530c. A partir de las imágenes de los geles se aplicó un protocolo de densitometría que permitió estimar la pureza de las preparaciones de proteína obtenidas.

3.2.2.4. Western blot

Para confirmar la identidad de las proteínas cuya expresión había sido inducida y que fueron obtenidas tras purificación se realizó un procedimiento de Western blot.

Las proteínas separadas mediante PAGE-SDS se transfirieron a filtros de nitrocelulosa Trans-Blot Transfer Medium (Bio-Rad) mediante el sistema de transferencia Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad). En primer lugar se sumergieron la nitrocelulosa y el filtro absorbente en el tampón de transferencia: TGS 1X (Bio-Rad) con un 20% de metanol y se

montó el sistema de transferencia eliminando las posibles burbujas que se hubieran formado. La transferencia se llevó a cabo a 4°C a 350 mA durante 2.5 horas en el caso de una sola membrana, y a 450 mA si se transferían dos membranas. Una vez terminada la transferencia se procedió a la detección específica de la Apo A-I del siguiente modo: las membranas se bloquearon durante toda la noche a 4°C con solución de bloqueo (PBS 1x, 0.2% Tween y 5% leche en polvo desnatada). A continuación las membranas se lavaron 4 veces durante 5 minutos con tampón de lavado (PBS 1x, 0.2% Tween) mediante agitación vigorosa. Tras el lavado, las membranas se incubaron 1 hora a temperatura ambiente y en agitación con un anticuerpo policlonal contra apo A-I humana de cabra (ab7613, Abcam) a una dilución 1: 10000 realizada con solución de bloqueo. Finalizada la incubación se procedió a lavar las membranas tal como se ha descrito anteriormente. Una vez lavadas las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario anti IgG de cabra (ab6741, Abcam) marcado con peroxidasa diluido 1:20000 con solución de lavado y en las mismas condiciones que la incubación primaria. Por último se lavaron de nuevo las membranas del modo ya descrito y se revelaron con Amersham ECL Plus™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Las imágenes se obtuvieron en el lector de quimiofluorescencia F-ChemiBIS 6.0 Pro (DNR Bio-Imaging Systems).

3.2.2.5. Cuantificación Proteica

La concentración de la proteína fue estimada mediante tres métodos de cuantificación, el método Bradford, por espectrofotometría directa midiendo absorbancia a 280nm y mediante ELISA.

3.2.2.5.1. Cuantificación proteica del Método de Bradford

El ensayo colorimétrico descrito por Bradford [215] se basa en la adición de un colorante de naturaleza ácida (azul de Coomassie) a la solución proteica con la consecuente medición de la absorbancia a 595nm. Para ello se utilizó el reactivo Protein Assay (Bio-Rad) y se siguió el protocolo del fabricante.

En primer lugar se preparó una recta de calibrado con albúmina bovina (Bio-Rad) disuelta en dH₂O con un rango de concentraciones entre 0.1-1.4mg/ml. En tubos de 5ml se añadieron 1.5ml de reactivo de Bradford 1X sobre 30µL de muestra. Inmediatamente, se agitaron y se pusieron en una gradilla protegida de la luz durante 5 minutos. Finalmente, se añadieron 300µL de cada mezcla en una microplaca de 96 pocillos por triplicado junto con la recta patrón y el blanco (PBS) por duplicado. Se midió la absorbancia a 595 nm de longitud de onda con el lector de absorbancia Microplate

Reader 680XR (Bio-Rad) controlando la lectura con el programa Microplate Manager (Bio-Rad).

3.2.2.5.2. Espectrofotometría directa

La medida espectrofotométrica directa a 280 nm se basó en la equivalencia aproximada de 1 unidad de absorbancia con una concentración de 1mg/ml de proteínas. Se utilizó el equipo Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) exceptuando el caso de las muestras dializadas donde se utilizó la ecuación de Beer-Lambert y un coeficiente de extinción molar para apo A-I de $32350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para calcular la concentración exacta [216].

3.2.2.5.3. Cuantificación por ELISA

Se analizó la concentración de apo A-I a lo largo de las diferentes etapas de producción utilizando un kit ELISA comercial (Mabtech) siguiendo las indicaciones del fabricante. El protocolo del ensayo utilizado usa como anticuerpo de captura un anticuerpo monoclonal contra apo A-I y como anticuerpo secundario otro anticuerpo monoclonal biotinilado, que es detectado mediante la actividad de una enzima peroxidasa de rábano conjugada con estreptavidina en presencia de un sustrato colorimétrico. El resultado fue adquirido con un equipo de lectura placas multipocillo Model 680 XR (Bio-Rad) a 450 nm y los datos obtenidos analizados con el programa Excel (Microsoft). Estos datos en combinación con las concentraciones de proteína total obtenida en cada paso de la producción y purificación de las proteínas permitieron elaborar una tabla de purificación para el proceso.

3.3. FORMACIÓN DE PARTÍCULAS RECONSTITUIDAS (rHDL)

3.3.1. Partículas HDL reconstituidas sin marcar

Las partículas de HDL reconstituidas (rHDL) fueron preparadas para cada proteína recombinante (apo A-I nat y Z) mediante el método de colato de sodio [217]. Los reactivos utilizados se muestran en la Tabla 12. La palmitoleilfosfatidilcolina (POPC)(Avanti Polar Lipids) y colesterol (Supelco) se añadieron a un tubo de cristal (previamente lavado con metanol y secado) y se secaron bajo N_2 . Después se resuspendieron en desoxicolato de sodio 19mM y se incubaron a 37°C durante 30 min bajo agitación suave. Tras este tiempo se añadió la proteína correspondiente (apo A-I nat o Z) a la mezcla y se continuó la incubación durante una hora adicional. Las partículas se dializaron extensivamente frente a PBS y se concentraron utilizando filtros Amicon® Ultra (Millipore).

Tabla 12. Reactivos para la preparación de partículas rHDL

Reactivo	Cantidad (mg)	Proporción molar
Palmitoyloleoyl phosphocholine (POPC)	2.38mg	95
Colesterol	0.06mg	5
Apolipoproteína A-I (nat o Z)	1mg	1
Desoxicolato de sodio 19mM	7.87mg	

3.3.2. rHDL fluorescentes

Las partículas rHDL fluorescentes fueron preparados de la misma forma que describimos anteriormente, pero sustituyendo el colesterol libre por 22-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-23,24-bisnor-5-cholen-3-ol (NBD-colesterol) (Sigma), que es una molécula de colesterol marcado fluorescentemente. Una vez generadas se midió la fluorescencia de las partículas referida a una cantidad fija de proteína, medido en un fluorímetro Synergy HT (BioTek) con una longitud de onda de excitación y de emisión de 488nm y 535nm respectivamente.

3.4. CARACTERIZACIÓN PROTEÍCA

3.4.1. Caracterización estructural

3.4.1.1. Comprobación de la mutación L144R por espectrometría de masas

La mutación L144R en la proteína expresada fue confirmada por dos métodos utilizando espectrometría de masas, llevados a cabo en la Unidad de Apoyo Transversal a la Investigación de Proteómica del I+CS.

La masa molecular fue determinada por análisis de MALDI-TOF MS en modo lineal. Brevemente, las proteínas fueron acidificadas por la adición de ácido trifluoroacético (TFA, concentración final 0.1%), y fueron concentradas y desaladas utilizando columnas ZipTip C18 (Millipore) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las proteínas fueron eluidas con 70% ACN/ 0.1% TFA/H₂O. Las muestras (0.5µl) y matriz (0.5µl, solución saturada de ácido sinapínico en 50% ACN/0.1% TFA/H₂O) fueron depositadas por duplicado en un inserto Opti-Tof de 384 pocillos (Applied Biosystems).

El análisis de MALDI-TOF MS fue realizado utilizando un analizador 4800plus MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems) en modo lineal y con un voltaje en aceleración de 20kV, con un rango de masas de 10.000 a 80.000Da, 1000 disparos/espectro y una intensidad de láser de 4800. Los espectros fueron calibrados externamente utilizando una mezcla estándar de proteínas (*ProteoMass Protein MALDI-MS Calibration Kit MSCAL3*, Sigma).

Para la segunda estrategia las proteínas fueron reducidas y alquiladas por incubación con 10 mM DTT a 56°C durante 45 min, seguido de una incubación con 55 mM yodoacetamida a temperatura ambiente en la oscuridad durante 45 min. Después, las proteínas fueron digeridas con tripsina durante toda la noche a 37°C (0.1 µg/µl, ratio de enzima:proteína 1:10). La digestión fue parada con la adición de 1% TFA, y los péptidos tripticos fueron extraídos secuencialmente con concentraciones incrementadas de acetonitrilo en H₂O. Los péptidos fueron concentrados y desalados utilizando columnas ZipTip C18 (Millipore) como se ha descrito anteriormente. Las muestras (0.5 µl) y matriz [0.5 µl solución saturada de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (CHCA) en 50% ACN/ 0.1% TFA/H₂O] fueron aplicadas por duplicado. Análisis por MALDI-TOF MS fue realizado en modo reflectante con voltaje en aceleración de 20kV, rango de masas de 800 a 4000 Da, 1000 disparos/espectro y una intensidad de láser de 2454. Los espectros de MSMS fueron realizados automáticamente en diez de los precursores más intensos, con 2000 disparos/espectro y una intensidad de láser de 3350. Los espectros fueron calibrados externamente utilizando una mezcla de proteínas estándar "4700 Calmix" (Applied Biosystems). Las proteínas fueron identificadas utilizando el buscador "Mascot Sequence Query". Los parámetros utilizados para realizar la búsqueda fueron las siguientes: "taxonomy all species, missed cleavage 1, fixed modifications carbamidomethyl (cysteines), peptide tolerance 0.1 Da (MS) 0.6 Da (MSMS), and Swiss-Prot database." Los "scores" de proteínas superiores a 70 fueron considerados significantes ($P < 0.05$).

3.4.1.2. Geles no-desnaturalizantes

Para confirmar el tamaño y homogeneidad de las partículas HDL reconstituidas además de caracterizar la estructura de la proteína en estado libre, se realizó electroforesis de geles de poliacrilamida no desnaturalizantes. Se utilizaron geles de gradiente de poliacrilamida de 4-12% (Invitrogen) y el marcado de pesos moleculares NativeMark Unstained Protein Standard (Invitrogen).

El equipo usado fue el Novex® Midi Gel System (Invitrogen) con una fuente electroforética Power Supply EPS 300 (Pharmacia Biotech). En todo momento se trabajó con condiciones no desnaturalizantes, con ausencia de SDS y β-mercaptoetanol tanto en los geles como en los tampones. Como tampón no-desnaturalizante se utilizó el tampón de tratamiento de muestra comercial Tris-Glycine Native Sample Buffer 2X (Invitrogen) el cuál se mezcló con las muestras a partes iguales. Las muestras se aplicaron en los pocillos sumergidos en el tampón de electroforesis Novex® Tris-Glycine Native Running Buffer 1X (Invitrogen). Las condiciones de electroforesis habituales fueron 2.5-3.5 horas a 125V, temperatura ambiente, o hasta que el frente de la electroforesis llegase al final

del gel. Posteriormente, se tiñeron los geles con SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen) durante 1 hora y se lavaron con dH₂O hasta que el fondo del gel estaba lo suficientemente claro.

3.4.1.3. Denaturalización Térmica

Para estudiar la estabilidad térmica de la apo A-I nat y apo A-I Z, y las partículas reconstituidas correspondientes, se llevaron a cabo pruebas de desnaturalización térmica desde 20°C hasta 100°C para tener un espectro de fluorescencia completo de temperaturas. Estos estudios se realizaron en colaboración con el Instituto de Nanociencia de Aragón (INA) de la Universidad de Zaragoza.

La desnaturalización se llevó a cabo diluyendo una muestra en PBS pH 7,4 y calentando en un baño desde una temperatura de 20°C hasta 100°C. Los espectros de fluorescencia fueron medidos en un espectrofluorímetro LS55 (Perkin Elmer) utilizando una longitud de onda de excitación de 285 nm. Se realizaron espectros en intervalos de 5°C.

3.4.1.4. Análisis del tamaño de partícula

El tamaño de partícula se analizó mediante una técnica de dispersión dinámica de la luz, utilizando un equipo Nanosizer (Malvern). Para ello se hicieron análisis de las proteínas en estado libre de tres modos distintos, en su estado original, con la muestra sonicada o con la muestra diluida y sonicada. Los experimentos fueron realizados en colaboración con el INA.

3.4.1.5. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

El tamaño de las partículas reconstituidas con apo A-I nat y apo A-I Z fue analizado mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), realizado en colaboración con el INA. Las medidas se realizaron en un microscopio de emisión térmica T20 (Tecnai) a 200 kV. Las partículas fueron depositadas sobre una rejilla modelo "holey carbon 300 mesh copper grid" (SPI Supplies). Se realizó una tinción de aurotioglucosa 1% para actuar como contraste.

3.4.1.6. Cromatografía de exclusión molecular

Para la cromatografía de exclusión molecular se trabajó con un equipo de cromatografía líquida FPLC ÄKTA Purifier 10 (GE Healthcare) especialmente diseñado para la purificación de proteínas en mezclas complejas. El perfil de la apolipoproteína A-I obtenida mediante FPLC se realizó en todos los casos a temperatura ambiente usando dos bombas P-900, un sistema de multi-inyección INV-907 con un loop de 2 mL, un

monitor ultravioleta (UV), de pH y conductividad UPC-900 y un colector de fracciones FRAC-950. Todas las operaciones se monitorizaron a 280 nm. El sistema se controla mediante el software UNICORN 5.1 (GE Healthcare). Todas las disoluciones utilizadas en la cromatografía se filtraron con un filtro de 0.42 μm (Membrane filters type GV, Duropore®, Millipore) y se sonicaron durante 1 minuto en el sonicador Bandelin Sonoplus a potencia mínima para evitar la entrada de aire al equipo. Las disoluciones se guardaron a 4°C siempre que no se estuviesen utilizando. Las muestras de apo A-I nat o Z se diluyeron hasta una concentración de 1mg/ml y se centrifugaron durante 2 minutos a 3000 rpm, se decantaron y se inyectaron en el equipo una muestra de 2 ml.

Mediante la técnica de cromatografía de exclusión molecular las proteínas se separan en función del tamaño eluyendo primero las mayores y por último las más pequeñas. Se utilizó el equipo descrito anteriormente y una columna Hi Load 16/60 Superdex 200 prep grade (GE Healthcare) de 120 mL de volumen. Como tampón de elución se utilizó PBS a un flujo constante de 0.5 ml/min. Una vez terminada la elución de las fracciones, se lavó la columna con un volumen de columna de PBS y otro de etanol al 20%.

3.4.2. Caracterización Funcional

Para la caracterización funcional de la apo A-I Z se ha analizado dos etapas claves en el transporte reverso de colesterol. La primera es la etapa inicial del transporte reverso mediado por el eflujo de colesterol de tejidos periféricos y la segunda es la última etapa del transporte reverso representado por la captación de colesterol por parte de las células hepáticas.

3.4.2.1. Ensayo de eflujo de colesterol

El eflujo de colesterol es una parte fundamental del proceso de transporte reverso de colesterol llevado a cabo por las partículas HDL. Para poder medir la capacidad de eflujo de las partículas creadas con las proteínas recombinantes producidas fue necesario diseñar un experimento in vitro que se aproximara lo más posible a las condiciones in vivo. Por ello se utilizó la línea monocítica celular THP-1 obtenida de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) [218], que tras adición de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) se diferencian a macrófagos. Estos macrófagos se cargaron de colesterol marcado radiactivamente y la capacidad de eflujo de las partículas fue medida por técnicas de detección radiactiva.

3.4.2.1.1. Cultivo de THP-1

La línea celular THP-1 se cultivó en un medio RPMI 1640 (Sigma) suplementado con 10% Suero Fetal Bovino (SFB), 2mM L-Glutamina (Gibco), 1x MEM NEAA (Gibco), 10mM HEPES (Gibco), 1mM piruvato sódico (Gibco), 0.5mM β -mercaptoetanol (Gibco), 100U/ml penicilina (Gibco), 100 μ g/ml estreptomycin (Gibco) y 1x Fungizone (Gibco). La línea celular se cultivó de manera rutinaria en frascos de cultivo (TPP®) de 75cm² en un incubador termostático con regulación electrónica de flujo de CO₂ Hera cell (Heraeus) a 37°C, en una atmósfera saturada de humedad con un 5% de CO₂.

3.4.2.1.2. Preparación de Metil- β -Ciclo-Dextrina (MBCD)

La Metil- β -Ciclo-Dextrina (MBCD) es un oligosacárido cíclico que presenta un exterior hidrofílico y una cavidad interior hidrofóbica donde puede acoger moléculas orgánicas no polares. Por esta razón se utilizó como el vector idóneo para cargar las células THP-1 diferenciadas con colesterol marcado radiactivamente.

Para ello, a un tubo de cristal limpio se añadieron 17.3 μ l de colesterol no marcado (10mg/ml, Supleco®) y 3.86 μ l de [$1\alpha, 2\alpha(n)$]-³H] colesterol (Amersham) y se secaron bajo N₂. Después se añadieron 6ml de medio THP-1 sin SFB y mezcló con 11.8mg de MBCD (Sigma). Se sometió la mezcla a agitación en baño de ultrasonidos hasta que se observó una completa resuspensión y finalmente se guardó la preparación a 4°C hasta el momento de usarla.

3.4.2.1.3. Análisis y contaje celular

En placas de doce pocillos (TPP®) se añadieron 0.625 10⁶ células THP-1 (pasaje 6) en un volumen final de 1ml de medio THP-1+PMA (1 μ g/ml, Sigma) y se dejaron incubando durante 3 días. Tras este tiempo más del 90% de las células cambia de un fenotipo monocítico no adherente a un fenotipo de macrófago adherente. Se eliminó el medio y se lavaron las células dos veces con 0.5ml de PBS y se añadieron 420 μ l de medio THP-1 sin SFB+PMA (0.5 μ g/ml) a cada pocillo. Se mantuvieron las células en incubación durante 24 horas. Después, se eliminó el medio y se incubaron durante 4 horas con 280 μ l de la preparación de MBCD. Tras las 4 horas se eliminó el medio y se lavaron dos veces con 0.5ml PBS. Seguidamente se añadieron 420 μ l de medio THP-1 sin SFB con 0.5 μ l/ml inhibidor de Acil-coenzima A:colesterol aciltransferasa (ACAT) Sandoz 58-035(Sigma) y se incubaron durante 24 horas. Finalmente, se añadieron 2ml de medio THP-1 sin FBS con el agente aceptor de colesterol correspondiente y con 0.5 μ l/ml inhibidor de ACAT a cada pocillo. Los medios de eflujo empleados fueron los siguientes:

medio THP-1 con SFB 10%, medio THP-1 sin SFB, medio THP-1 con 1% SFB, apo A-I nat 30µg/ml, rHDL nat 30µg/ml, apo A-I Z 30µg/ml y rHDL Z 30µg/ml.

Se recogieron alícuotas de 500µl a 4h, 8h, 12h y 24h. A las 24h se recogió también el lisado celular para poder analizar el contenido de colesterol retenido en la fracción celular. Para ello se añadió 1ml de NaOH 1M a cada pocillo y se incubó en una estufa a 37°C durante 2 horas. Después se recogió el medio en tubos eppendorf.

Para realizar el análisis con el contador de centelleo líquido, las muestras se centrifugaron a 14.000 r.p.m. durante 15 min en una microcentrífuga Spectrafuge 16M (Labnet). Después se cogieron tres alícuotas de 100µl de cada muestra y se añadieron a viales de centelleo (Kartell). Sobre estos se añadieron 2ml de ACS Scintillation Cocktail (GE) y se mezclaron en un agitador. La medición de la radiactividad se hizo en un equipo Wallac 1209 Rackbeta Liquid Scintillation Counter (LKB) con medidas de 30 seg.

3.4.2.2. Ensayo de captación de colesterol

Además del la captación de colesterol en tejidos periféricos, el transporte reverso de colesterol llevado a cabo por las partículas HDL implica el transporte y donación de dicho colesterol a los hepatocitos donde puede ser metabolizado. Esta capacidad como donador de colesterol podría estar aumentada en el caso de la apo A-I Z, confiriéndole sus propiedades antiaterogénicas. Para poder comprobar esta hipótesis se diseñó un experimento in vitro utilizando la línea celular hepática HepG2, y partículas reconstituidas con colesterol marcado fluorescentemente denominado 22-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-23,24-bisnor-5-cholen-3β-ol (NBD-colesterol)(Invitrogen). Se hicieron medidas utilizando citometría y microscopia de fluorescencia.

3.4.2.2.1. Cultivo de HepG2

La línea celular HepG2, obtenida de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC)[219], se cultivó en un medio EMEM(EBSS) (Sigma) suplementado con 10% Suero Fetal Bovino (SFB), 2mM L-Glutamina (Gibco), 1x MEM NEAA (Gibco), 1mM piruvato sódico (Gibco), 100U/ml penicilina (Gibco), 100µg/ml estreptomycin (Gibco) y 1x Fungizone (Gibco). La línea celular se cultivó de manera rutinaria en frascos de cultivo (TPP®) de 75cm² en un incubador termostatzado con regulación electrónica de flujo de CO₂ Hera cell (Heraeus) a 37°C, en una atmósfera saturada de humedad con un 5% de CO₂.

3.4.2.2.2. Microscopía de fluorescencia

En placas de 24 pocillos con cubres de cristal se sembró 5×10^5 células HepG2 (pasaje 3-8) y se dejaron incubando durante 24 horas en medio HepG2. Tras este tiempo, se eliminó el medio y se añadió medio fresco con partículas HDL fluorescentes reconstituidas con apo A-I nat o apo A-I Z. Se incubaron durante 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas y 5 horas a dos concentraciones distintas. Tras este tiempo se procedió al montaje de los cristales para su visualización en microscopio de fluorescencia. Para ello se lavaron los pocillos dos veces con 2 ml de PBS y se incubaron durante 15 min con 500µl de paraformaldehído (PFA) 3%. A continuación se volvieron a lavar los pocillos dos veces con 2 ml PBS, dejándolos después en 500µl de PBS con 10µ de NH_4Cl 1M. Finalmente se sacaron los cubres de cristal, se lavaron con suavidad en agua MilliQ y se montaron en portas con 5µl de medio de montaje Fluoromount (Sigma). Se dejaron secar y se guardaron a -20°C hasta su visualización en el microscopio de fluorescencia de la Unidad de Apoyo Transversal a la Investigación de Microscopía e Imagen del I+CS.

3.4.2.2.3. Citometría

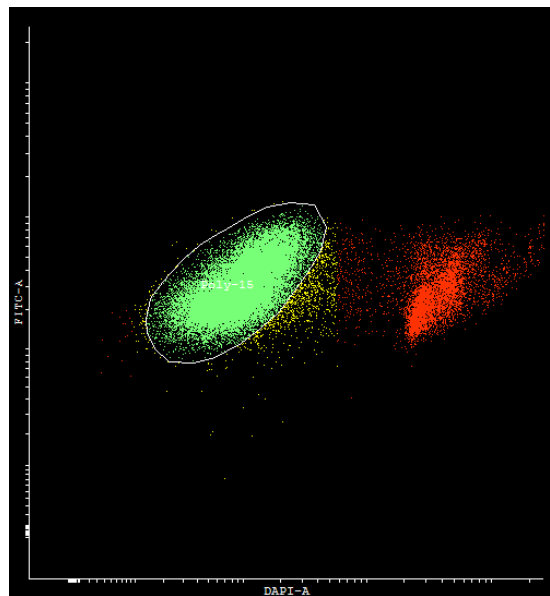
Se analizó mediante citometría de flujo la cantidad de colesterol marcado (NBD-colesterol) que resultó captado por parte de células HepG2 desde partículas reconstituidas con apo A-I nat o Z.

En placas de doce pocillos se sembraron 5×10^5 células por pocillo en un volumen final de 1.5ml de medio HepG2 y se mantuvieron en cultivo durante 5 días. Tras este tiempo, se eliminó el medio y se añadió medio fresco con partículas HDL fluorescentes reconstituidas con apo A-I nat o apo A-I Z. Se incubaron durante 5min, 10min, 20min, 30min y 1 hora a dos concentraciones distintas. Después se eliminó el medio y se lavaron los pocillos dos veces con 2ml de PBS y a continuación se añadieron 150µl de 0.25% tripsina (Gibco) y se incubaron durante 4 min a 37°C . Transcurrida la incubación, se añadieron 300µl de medio HepG2 para inactivar la actividad de la tripsina, las células en suspensión se transfirieron a tubos estériles de fondo cónico (TPP®) y se centrifugaron durante 5 min a 1200 r.p.m. en una centrífuga 3K10 (Sigma). Finalmente se eliminó el medio y se resuspendieron los *pellets* en 500µl de PBS.

Las células resuspendidas se marcaron con el colorante vital fluorescente Sytox Blue (Invitrogen) para poder diferenciar células viables y se analizaron en un citómetro FACSaria (BD Biosciences) controlado por el software FACSDiva v.6.1.3 (BD Biosciences) en la Unidad de Apoyo Transversal a la Investigación de Separación Celular del I+CS. Por duplicado, se adquirieron 50.000 eventos por condición de tiempo y concentración de

partículas donoras y se utilizaron células no incubadas con partículas reconstituidas como control negativo. El análisis de datos se realizó utilizando el programa Cyflogic v.1.2.1 (CyFlo) seleccionando una población de células homogénea en el diagrama tamaño/complejidad (FSC/SSC) y visualizando esta población en un diagrama bidimensional de fluorescencias en el canal del DAPI (para el marcaje con Sytox Blue) y en el canal de FITC (para el marcaje del colesterol-NBD). Se seleccionó la población viable y homogéneamente marcada para el colesterol y se obtuvieron los valores medios de fluorescencia en el canal de FITC, a partir de los cuales se determinó la captación de colesterol por parte de las células.

Figura 21. Imágen obtenida de citometría de flujo



La imagen muestra una población de células homogénea representada en el diagrama bidimensional de fluorescencias en el canal del DAPI y en el canal de FITC. La población de color rojo representa las células no viables, y las de color verde representan las células viables con marcaje fluorescente, utilizadas para obtener las medias de captación.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS

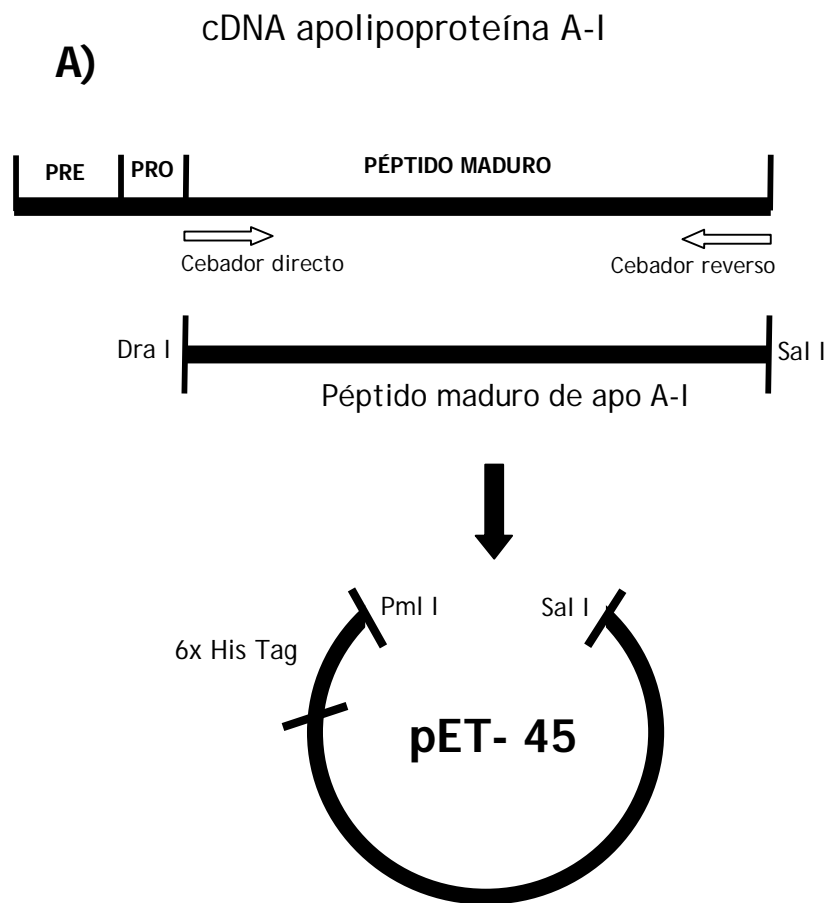
4.1.1. Obtención de los plásmidos de expresión para apo A-I nativa y apo A-I Z

Como se ha descrito en Material y Métodos (ver apartado 3.1.), la generación del plásmido de la apo A-I nativa fue realizada tomando únicamente la secuencia del péptido maduro de la apo A-I nativa e introduciéndolo en el plásmido de expresión pET-45 por medio de la utilización de enzimas de restricción (Figura 22.A).

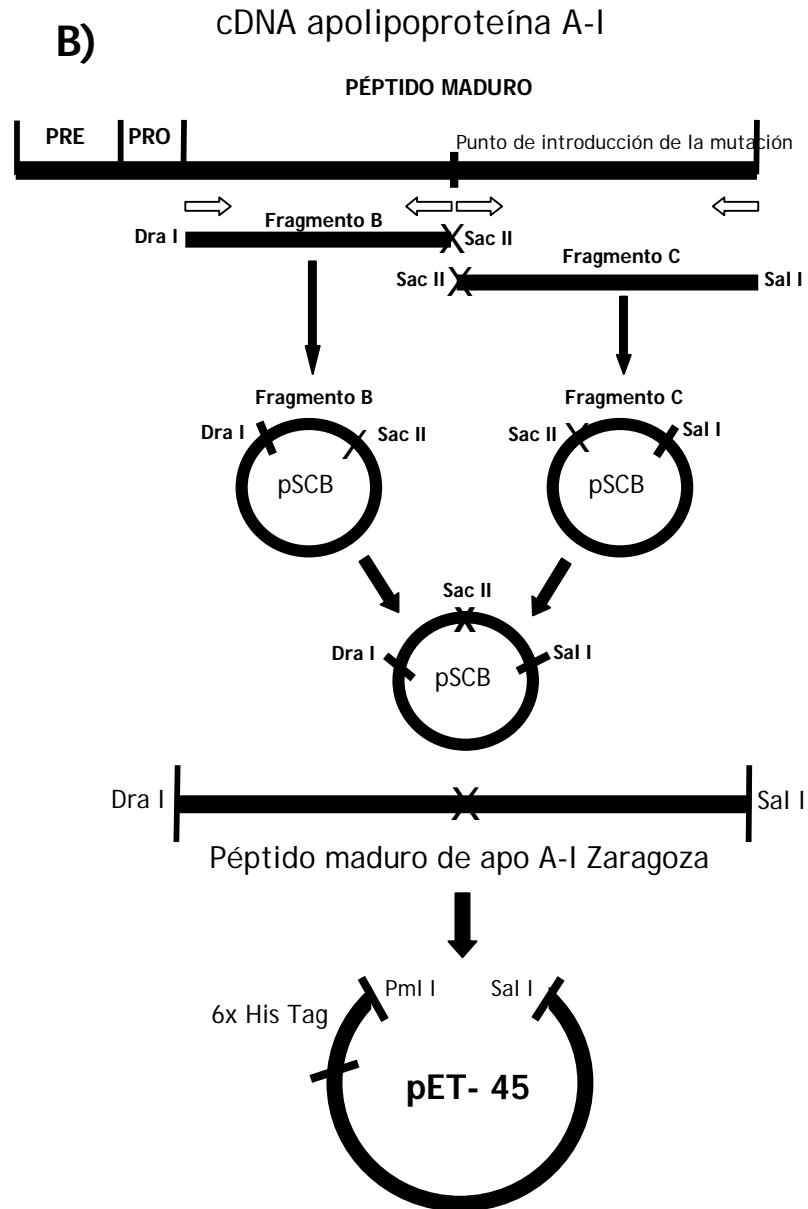
Para generar la apo A-I Z fue necesario generar dos fragmentos distintos solapantes con un sitio de restricción único que permitió la reconstitución de la secuencia completa con la mutación tras clonaje por separado en un vector común (Figura 22.B).

En ambos casos el primer paso a realizar fue la comprobación de los fragmentos generados por PCR.

Figura 22. Esquema de la generación de plásmidos

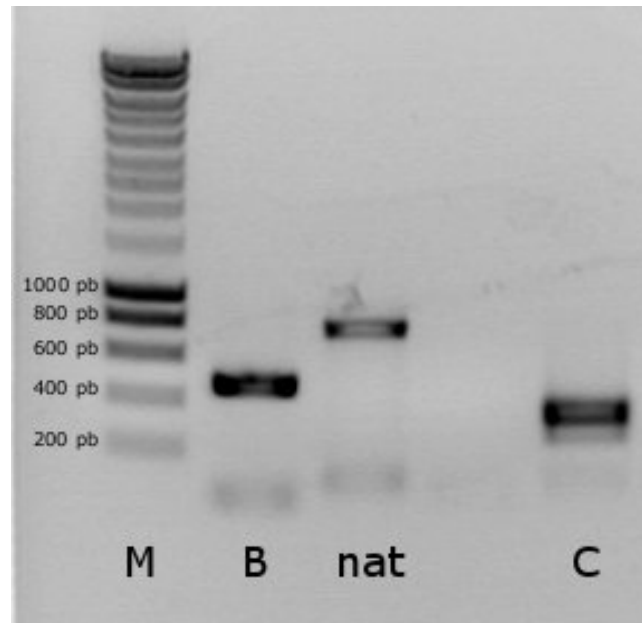


Esquema del método utilizado para obtener los plásmidos de expresión de apo A-I nativa madura.



Esquema del método utilizado para obtener los plásmidos de expresión de apo A-I Z obtenido por la unión de los fragmentos B y C con el sitio de restricción único Sac II.

Se analizaron los productos de PCR resultado de la modificación de apo A-I o mutagénesis por electroforesis en un gel de agarosa preparado al 1% y teñido con bromuro de etidio. Se empleó el marcador de peso molecular SmartLadder (Eurogentec) (rango de 200-10.000 pb) y la electroforesis se llevó a cabo durante 30 min a 120 mV (Figura 23).

Figura 23. Productos de PCR resultado de modificación o mutagénesis

Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carriles: M, marcador de pesos moleculares; B, Fragmento B; nat, apo A-I nat; C, Fragmento C.

Como puede apreciarse en la Figura 23 las bandas correspondientes a la apo A-I nat y fragmento B fueron del tamaño esperado pero la banda correspondiente al fragmento C no fue una banda nítida sino que se apreciaban 2 bandas adyacentes de distinto peso molecular. De las dos bandas que se observaron, la de tamaño superior era la que correspondía con el peso esperado para el fragmento C y se procedió a su extracción del gel y posterior purificación.

El resultado de la purificación de los fragmentos B y C fue visualizado de nuevo en un gel de agarosa del 1% junto con un marcador de peso molecular. Se comprobó la existencia de una única banda correspondiente al fragmento C con el peso molecular esperado.

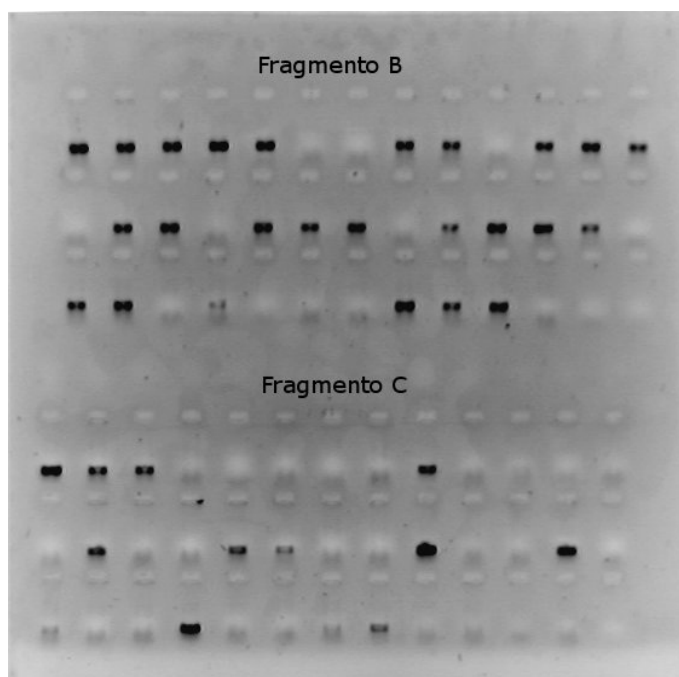
4.1.2. Análisis del inserto por detección de colonias positivas mediante PCR

Una vez obtenidos los productos de PCR puros, se subclonaron en el plásmido pSCB (ver apartado 3.1.2.2). Para evaluar el éxito de la transformación, se realizó amplificación por PCR de los fragmentos B y C directamente desde los cultivos en 4ml de medio LB producidos a partir de colonias resistentes a ampicilina tras la transformación de células E.coli XL-1 con el correspondiente producto de ligación. Se visualizaron los productos de PCR mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% y teñido con bromuro de etidio,

sin marcador, únicamente para detectar la presencia o ausencia de amplificación. La detección de una banda indicó la presencia del plásmido con inserto.

Se seleccionaron aquellos cultivos que habían resultado ser positivos para realizar la obtención de DNA plasmídico con el fin de tener DNA plasmídico para secuenciar (Figura 24).

Figura 24. PCR de colonias



Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Las tres filas superiores corresponden a los productos de PCR correspondientes al Fragmento B y las tres filas inferiores corresponden a los productos de PCR del Fragmento C.

4.1.3. Comprobación del sentido del inserto y secuenciación

Se llevó a cabo una digestión con SacII de los plásmidos que contenían el fragmento B y C para conocer en que sentido se encontraban los insertos de acuerdo con el esquema mostrado en la Figura 19 y así elegir las muestras más adecuadas para producir la apo A-I Zaragoza completa.

De las 9 muestras del fragmento B que se digirieron, solo 2 estaban aparentemente en el sentido correcto, y de las 10 muestras del fragmento C, 4 aparentemente estaban en el sentido correcto. Todas estas muestras se analizaron por secuenciación.

De las 2 muestras del plásmido M1 que se secuenciaron solo una de ellas resultó tener la secuencia correcta y de las 4 muestras del plásmido M2 únicamente había una con la secuencia correcta. Las demás contenían mutaciones que alteraban la secuencia.

Conocidos estos datos se decidió seguir el experimento únicamente utilizando las muestras con secuencia y sentido correctos en ambos casos.

4.1.4. Construcción del fragmento A

Para obtener la secuencia completa de apo A-I Z (fragmento A) fue necesaria la unión de los fragmentos B y C generados anteriormente, utilizando la enzima de restricción SacII. El fragmento B se mantuvo dentro del plásmido pSCB, eliminándose una pequeña secuencia de plásmido flanqueante en posición 3', mientras que en el caso del fragmento C, se extrajo el fragmento del plásmido con SacII y se introdujo en posición 3' del fragmento B en el plásmido (proceso de digestión y ligación, apartados 3.1.2.2.6) (Figura 22.B). El producto de la ligación se utilizó para la transformación de células competentes, cuyo resultado se pudo apreciar realizando una detección de colonias positivas mediante amplificación por PCR. El resultado fue positivo ya que se observaron varias colonias en la placa del fragmento A y todos los controles realizados resultaron negativos.

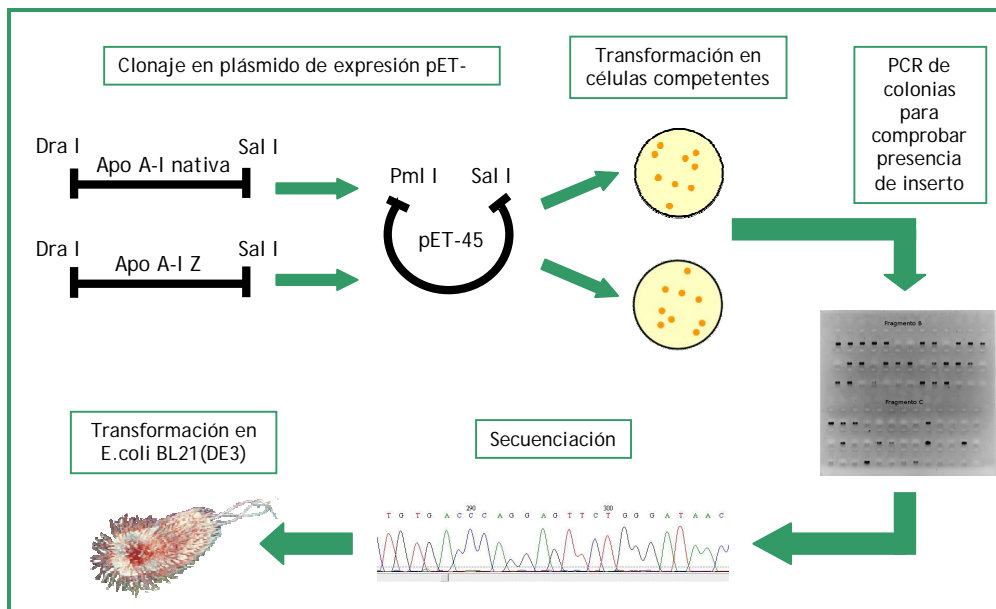
4.1.5. Subclonaje en el plásmido de expresión

Para introducir las secuencias de apo A-I nat y apo A-I Z generadas en el plásmido de expresión pET-45, fue necesario el uso de las enzimas de restricción Dra I y Sal I para digerir el fragmento, y Pml I y Sal I para digerir el plásmido. El resultado de la doble digestión se visualizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% y teñido con bromuro de etidio. Una vez comprobada la presencia del fragmento esperado se procedió a la extracción y purificación de las bandas de interés. Después se realizó la ligación correspondiente y transformación en células competentes. El resultado de la transformación se comprobó con la presencia de colonias en placas de LB/agar con ampicilina. El resultado fue positivo para las placas de interés y negativo para los controles, tal como cabía esperar (Figura 25).

Se realizó una detección de colonias positivas mediante PCR para comprobar la presencia de los insertos adecuados. El resultado se visualizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. Se seleccionaron aquellos cultivos que habían dado positivo para la amplificación del fragmento de interés. De aquí en adelante solo se trabajó con estas muestras positivas y uno negativo como

control. Una vez purificados los plásmidos correspondientes se procedió a su secuenciación.

Figura 25. Esquema del Subclonaje en plásmidos de expresión



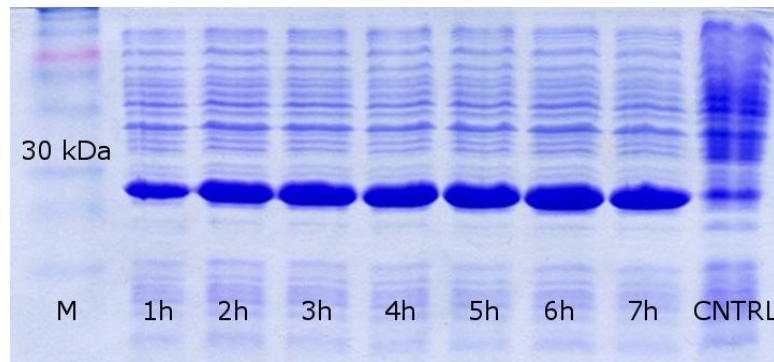
Se obtuvo una muestra correcta para la apo A-I nat, y una de apo A-I Z. Éstos plásmidos fueron los utilizados para transformar las células BL21 (DE3) y continuar con la expresión proteica. Los "stocks" de estos cultivos fueron usados para todas las producciones de proteína posteriores.

4.2. EXPRESIÓN PROTEICA

4.2.1. Inducción de cultivo de células BL21 (DE3)

El resultado de los distintos tiempos de inducción se analizó mediante electroforesis en geles PAGE-SDS (Figura 26). Se observó claramente una sobreproducción de una proteína de aproximadamente 30 kDa que corresponde aparentemente con la apo A-I (tanto nat como Z) que tiene un peso aproximado de 29 kDa. Analizando el resultado de los distintos tiempos de inducción, se decidió que el tiempo óptimo de inducción era de 120 minutos.

Figura 26. Inducción de cultivo



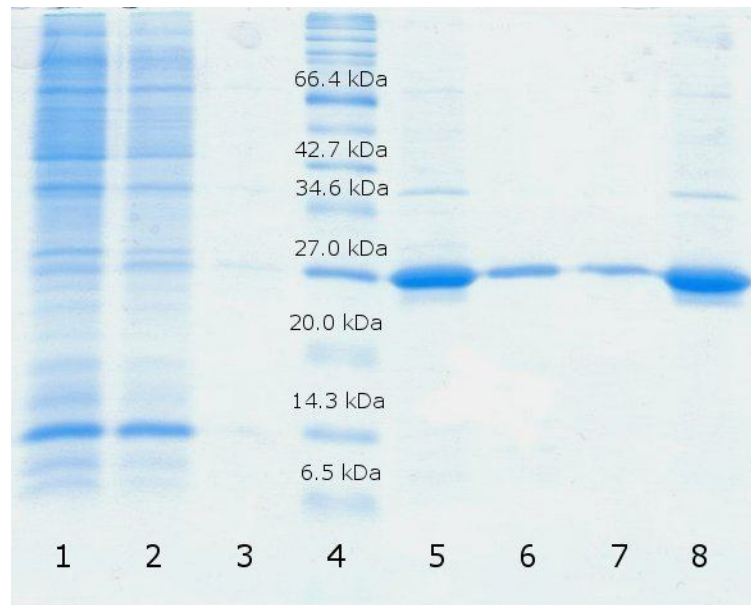
PAGE-SDS de cultivos inducidos de apo A-I nat a distintos tiempos. Condiciones de electroforesis: 120v, 1 hora 30 minutos. Carriles: M, marcador; CNTRL, control sin inducir mantenido 7 horas.

4.2.2. Purificación de proteína en columnas de Níquel

La purificación de las proteínas apo A-I nat y Z fue realizada mediante un protocolo no desnaturizante en columnas de afinidad de níquel. Cada etapa de la purificación fue sometida a pruebas de PAGE-SDS y Western blot para realizar un seguimiento de la proteína en cada momento.

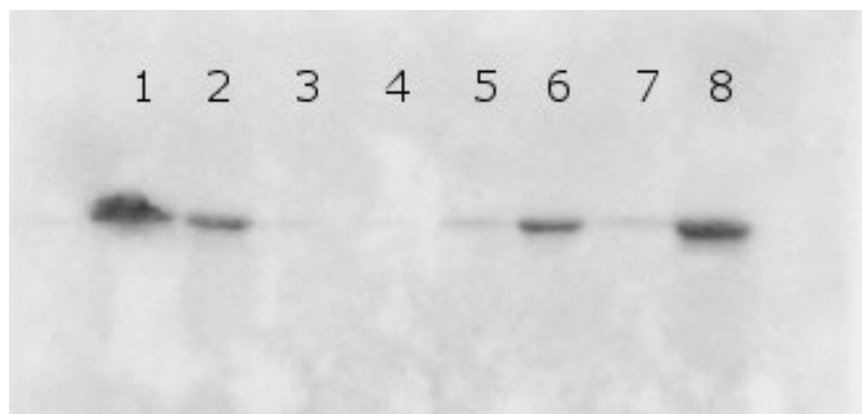
El resultado del PAGE-SDS mostró una banda mayoritaria en cada paso en torno a 29 kDa que corresponde con la apo A-I (nat o Z) y una eliminación progresiva de bandas inespecíficas a medida que avanza la purificación (Figura 27). En el primer eluido se observó la mayor parte de la proteína retenida en la columna, y ya no se observa prácticamente ninguna otra banda proteica. La fracción recogida en la primera elución fue sometida a concentración y diálisis frente a PBS en filtros Amicon® Ultra (carril 8 de Figura 26). Esta fracción fue la empleada en estudios posteriores. El escalado a mayores volúmenes de cultivo para inducir la expresión proteica se realizó sin ser necesarias variaciones respecto a las condiciones de crecimiento y tiempo de inducción de los cultivos previamente utilizados.

Aplicando un protocolo de densitometría, en la que se compara y cuantifica la intensidad y tamaño de las bandas separadas por electroforesis, se pudo determinar que la pureza de las preparaciones estaba en torno al 94% tanto para la apo A-I nat como para la apo A-I Z.

Figura 27. PAGE-SDS de las etapas de purificación proteica

PAGE-SDS (15% de poliacrilamida) de las fracciones de purificación de apo A-I nat. Condiciones de electroforesis: 50V 30 minutos, 100V 1 hora 30 minutos. Carriles: 1, proteínas no retenidas en la columna; 2, primer lavado; 3, segundo lavado; 4, marcador de pesos moleculares; 5, primera elución; 6, segunda elución; 7, tercera elución; 8, primera elución dializada y concentrada.

Para confirmar que la proteína sobreexpresada correspondía realmente con la apo A-I se utilizó la técnica de Western blot (Figura 28).

Figura 28. Western blot de las etapas de purificación proteica

Western blot de la apo A-I Z en sus distintas etapas de purificación. Carriles: 1, lisado bacteriano tras sonicación; 2, sobrenadante obtenido tras centrifugación del lisado sonificado; 3, marcador de pesos moleculares; 4, proteínas no retenidas en la columna; 5, primer lavado; 6, primera elución; 7, segunda elución; 8, primera elución dializada y concentrada.

Como se observa en la Figura 28 se detectó la presencia de apo A-I en todas aquellas fracciones esperadas.

4.3. EVALUACIÓN DEL PROCESO DE PURIFICACIÓN

La cuantificación proteica por el método de Bradford permitió obtener para cada etapa la concentración de proteína total presente en la muestra (Tabla 13). Estos datos en combinación con los que se obtuvieron de la cuantificación por ELISA, permitieron calcular el rendimiento del proceso de purificación. Con objeto de realizar un seguimiento de las etapas de la purificación se usó un análisis por ELISA que permitió determinar la concentración de apo A-I a lo largo de las etapas de purificación. Se utilizó el porcentaje de la cantidad de apo A-I respecto a la cantidad de proteína total como parámetro para valorar el porcentaje de la purificación (Tabla 13). Del análisis de los datos obtenidos se puede estimar que tras el tiempo óptimo de inducción alrededor del 4,5% de la proteína total en el cultivo era apo A-I, de toda esta apo A-I expresada un 85% se recupera en la fracción soluble del lisado bacteriano y tras la purificación mediante cromatografía de afinidad y la posterior diálisis en PBS se obtiene aproximadamente un 55% de la proteína en forma soluble (correspondiente aproximadamente al 45% de la apo A-I producida en el cultivo). El rendimiento final obtenido fue de alrededor de 30 mg de apo A-I por litro de cultivo con una pureza superior al 90%. No se observaron diferencias en los parámetros de purificación ni el rendimiento final entre la apo A-I nativa y la apo A-I Zaragoza.

Tabla 13. Tabla de purificación de las proteínas

		Lisado y sonicado	Sobrenadante tras centrifugación	Sobrenadante no retenido por la columna	Lavado 1	Diálisis
APO A-I NATIVA	[Proteína total] mg/ml	28.85	25.00	19.04	6.49	0.54
	[Apo A-I] mg/ml	1.38	1.17	0.04	0.02	0.51
	[Apo A-I] / [Proteína total] (%)	4.78	4.67	0.19	0.3	94.35
APO A-I Z	[Proteína total] mg/ml	27.43	21.90	16.19	6.08	0.65
	[Apo A-I] mg/ml	1.23	1.05	0.02	0.01	0.61
	[Apo A-I] / [Proteína total] (%)	4.49	4.80	0.15	0.23	93.92

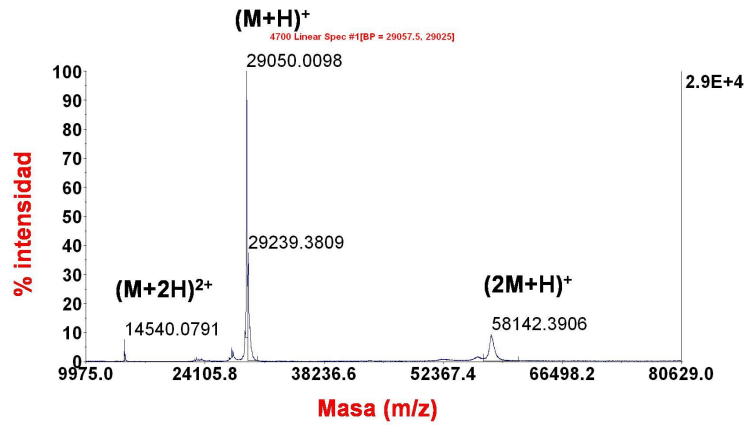
4.4. CARACTERIZACIÓN PROTEICA

4.4.1. Comprobación de la mutación L144R mediante espectrometría de masas

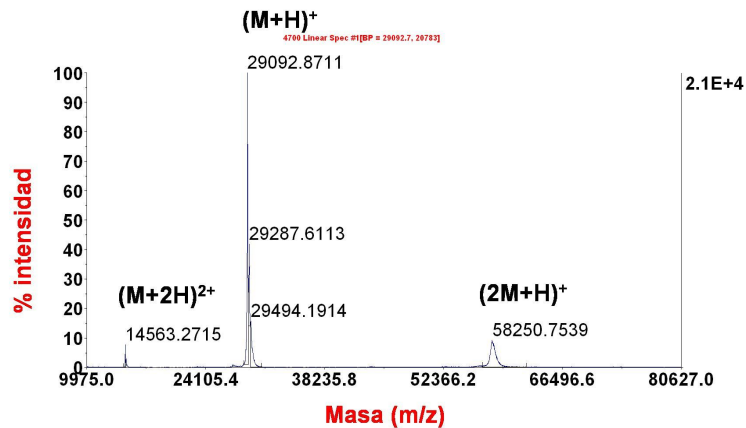
El análisis por espectrometría de masas confirmó la presencia de la mutación L144R en la proteína apo A-I Z expresada. Las masas moleculares del apo A-I nat recombinante y apo A-I Z fueron de 29.049,0 Da y 29.091,9 Da respectivamente, por análisis de MALDI-TOF MS en modo lineal (Figura 29). La diferencia de masa de 42.9 Da es consistente con el desplazamiento de masa producida por la substitución del aminoácido Leucina (L) por Arginina (R) (L: 131,17 y R:174,20, $\Delta Da = 43$). Además, los espectros de masas confirmaron la pureza de las muestras, ya que todos los iones observados correspondían a la proteína de interés $(M+H)^+$, la proteína doblemente cargada $(M+2H)^{2+}$, y el dímero $(2M+H)^+$.

Figura 29. Espectros de MALDI-TOF MS en modo lineal

A) Apo A-I nat



B) Apo A-I Z



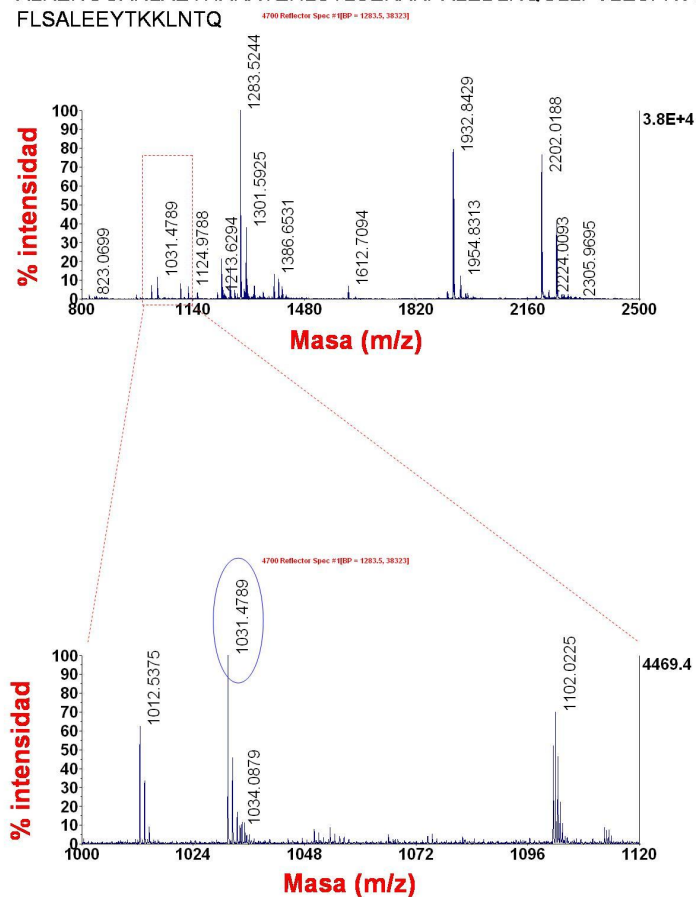
Panel A: Espectros de MALDI-TOF MS en modo lineal de apo A-I nat. Panel B: Espectros de MALDI-TOF MS en modo lineal de apo A-I Z.

El análisis de los péptidos tras la digestión con tripsina de las dos proteínas también demostró la presencia de la mutación L144R. La tripsina digiere las proteínas tras los residuos de lisina (K) o arginina (R) cuando no están seguidos de prolina. En la apo A-I nat recombinante, un péptido de 1031,46 Da debería de ser generado desde el aminoácido 165 hasta la 173 con la secuencia LSPLGEEMR, mientras que en la proteína mutada, la digestión debería producir dos péptidos más pequeños: LSPR (471,55 Da) y GEEMR (620,67). Los espectros de masa de la apo A-I nat revelaron la presencia de 1031,48 m/z, mientras que en el caso de la apo A-I Z este péptido no pudo ser detectado (Figura 30). Finalmente, la identidad de las proteínas fue verificada utilizando datos de MS y MSMS y el buscador Mascot (*ApoA1 HUMAN*, P02647, 60% *sequence coverage*, Mascot score = 987).

Figura 30. Espectros de MALDI-TOF MS en modo reflectante

A) Apo A-I nat

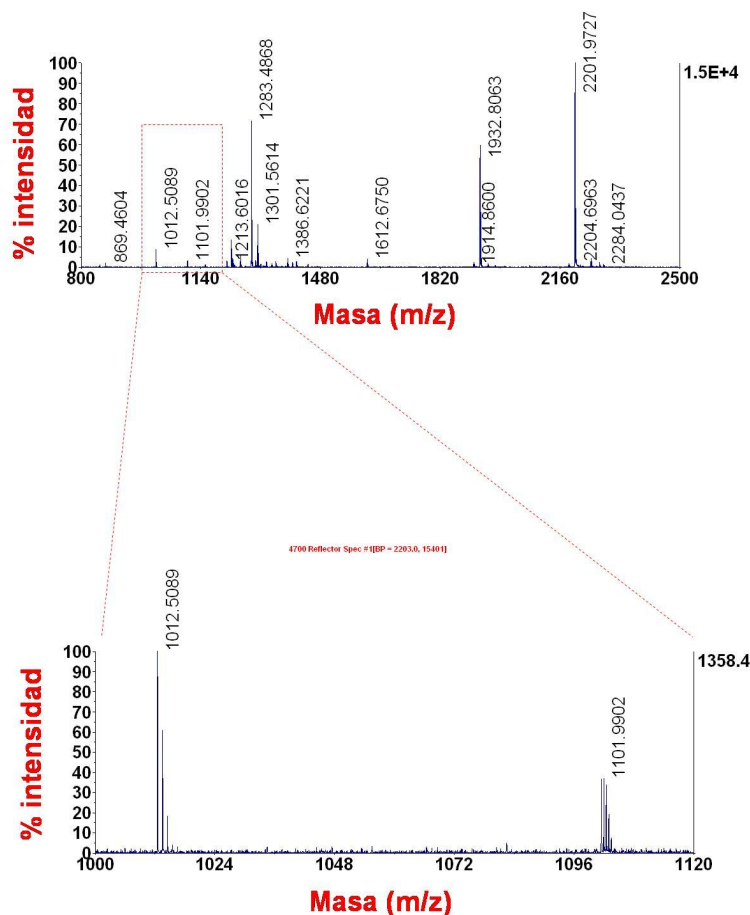
MAHHHHHHKDEPPQSPWDRVKDLATVYVDVLKDSGRDYVSQFEGSA
 LGKQLNLKLLDNWDSVTSTFSKLREQLGPVTQEFWDNLEKETEGLRQ
 EMSKDLEEVKAKVQPYLDDFQKKWQEEMELYRQKVEPLRAELQEGAR
 QKLHELQEK**LSP**L**GEEMR**DRARAHVDALRTHLAPYSDELQRRLAARLE
 ALKENGGARLAEYHAKATEHLSTLSEKAKPALEDLRQGLLPVLESFKVS
 FLSALEEYTKLNTQ



Espectros de MALDI-TOF MS en modo reflectante de digestiones tríplicas de apo A-I nat. Una zona del espectro se amplió para resaltar la presencia del péptido de 1031.48 Da que corresponde a la secuencia con los aminoácidos en azul (en rojo se presenta la mutación).

B) Apo A-I Z

MAHHHHHHKDEPPQSPWDRVKDLATVYVDVLKDSGRDYVSQFEGSA
 LGKQLNLKLLDNWDSVTSTFSKLREQLGPVTQEFWDNLEKETEGLRQ
 EMSKDLEEVKAKVQPYLDDFQKKWQEEMELYRQKVEPLRAELQEGAR
 QKLHELQEKLSPRGEEMRDRARAHVDALRTHLAPYSDELRLAARL
 EALKENGGARLAEYHAKATEHLSTLSEKAKPALEDLRQGLLPVLESFKV
 SFLSALEEYTKLNTQ



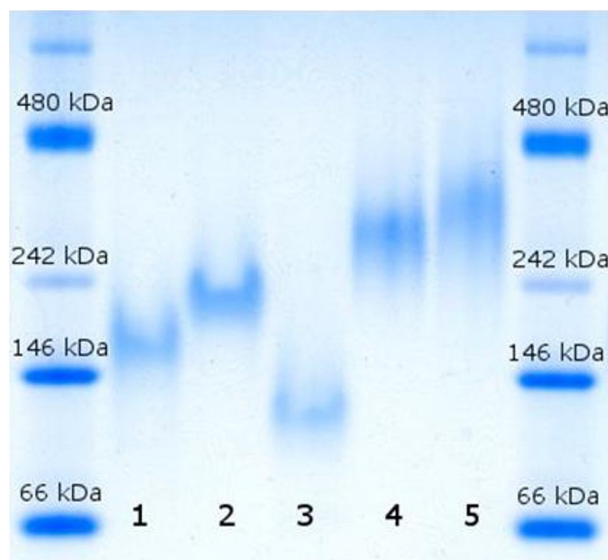
Espectros de MALDI-TOF MS en modo reflectante de digestiones tripticas de apo A-I Z. Una zona del espectro se amplió para resaltar la presencia del péptido de 1031.48 Da que corresponde a la secuencia con los aminoácidos en azul (en rojo se presenta la mutación).

4.4.2. Geles no desnaturizantes

Para confirmar el tamaño y homogeneidad de las partículas de HDL reconstituidas además de caracterizar la estructura de la proteína en estado libre, se analizaron geles no desnaturizantes según se ha descrito en el apartado de Material y Métodos 3.4.1.2. En los geles de gradiente de 4-12% se visualizaron las proteínas libres y partículas reconstituidas tanto con apo A-I nat como apo A-I Z. En ambos casos las partículas se generaron correctamente, con un tamaño superior a la de la proteína libre indicando la formación de partículas. Sin embargo se detectó una diferencia de movilidad entre la

apo A-I nat y apo A-I Z tanto en forma libre como formando partículas. En ambos casos la apo A-I nat presentó mayor movilidad que la apo A-I Z, aunque este efecto es más pronunciado en el caso de proteína libre (Figura 31). Además se observó que el tamaño de las proteínas en forma libre fue muy superior a la esperada.

Figura 31. Electroforesis en gel no-desnaturalizante de gradiente de poliacrilamida 4-12%



Electroforesis en gel no-desnaturalizante (gradiente 4-12%) de apo A-I libre y formando partículas reconstituidas. Condiciones de electroforesis: 125V, 2 horas. Carriles: 1, apo A-I nat libre; 2, apo A-I Z libre; 3, apo A-I humana comercial; 4, rHDL de apo A-I nat; 5, rHDL de apo A-I Z.

4.4.3. Desnaturalización Térmica

La proteína nativa presenta 2 picos característicos de emisión de fluorescencia a 339 y 359 nm, siendo mayor el primero. En la desnaturalización térmica hasta 100°C de la apo A-I nat se observó un progresivo incremento del segundo pico hasta casi igualar la emisión del primero. El aumento de la fluorescencia en el rango 350-360 nm indica una mayor exposición al solvente de los residuos de triptófano lo cual implica la desnaturalización de la proteína. El análisis del ratio 353/333 nm, usada para cuantificar el desplazamiento espectral [220], indicó que la proteína no había alcanzado un estado de completa desnaturalización a 100°C. El efecto de la temperatura en la proteína mutante fue más notable que en la nativa y la relación 353/333 nm alcanzó a 100°C un valor comparable a la proteína prácticamente desnaturalizada. Además la forma de curva de emisión de la apo A-I Z es ligeramente distinta a la de la apo A-I nat,

indicando diferencias estructurales (Figura 32.A). Además, en ningún caso se produjo el replegamiento espontáneo de las proteínas al volver a temperatura ambiente.

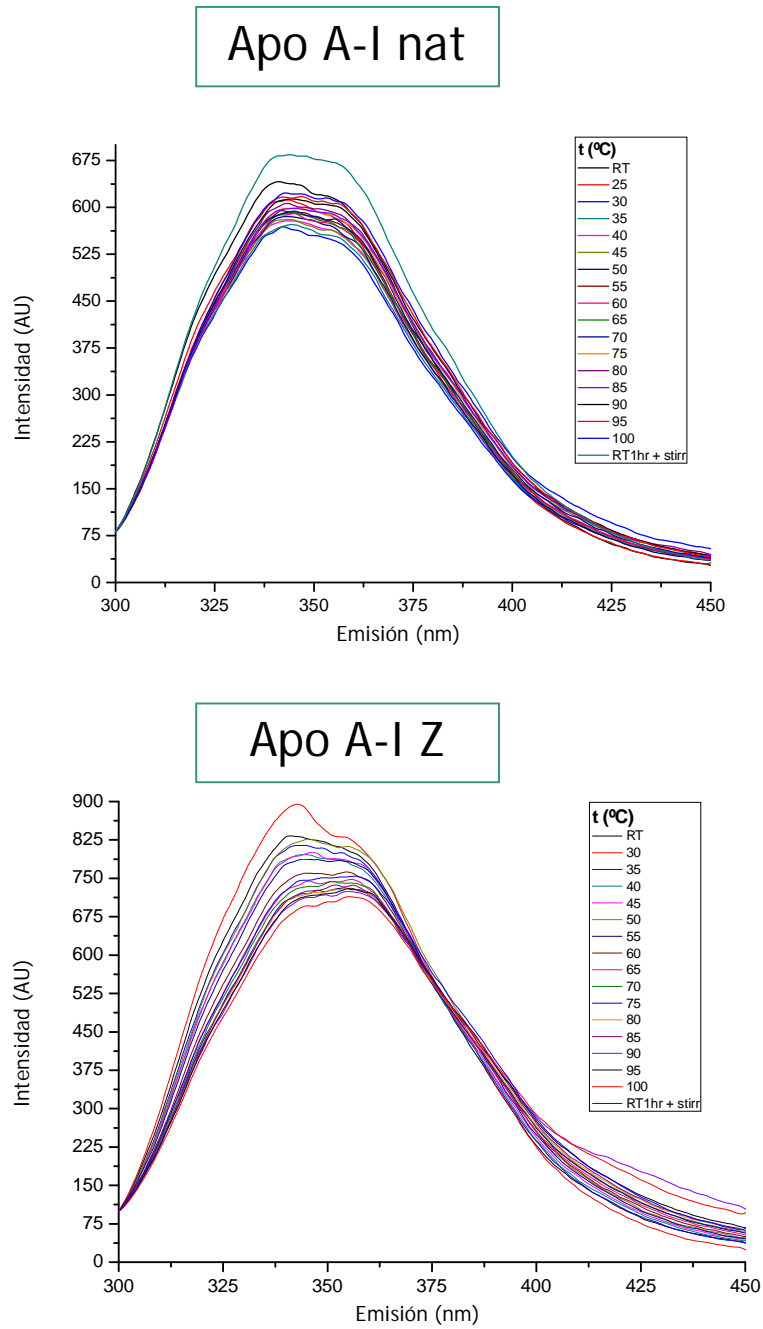
En el espectro de emisión de las rHDL de apo A-I nat (rHDL nat) se observó un cambio notable, con un desplazamiento del máximo hacia la derecha, y el rango de la relación 353/333 nm desde los 20 hasta los 100°C fue más amplio y con valores más altos que para la apo A-I nat libre (Figura 32.B.). Ambos hechos indican que la unión de lípidos hace que la proteína se reorganice estructuralmente, siendo la rHDL nat resultante menos resistente a la temperatura que la apo A-I nat.

En el espectro de las rHDL de apo A-I Z (rHDL Z) se observó un ensanchamiento progresivo del espectro de emisión a partir de los 30°C hasta los 100°C y el máximo se desplazó hacia la derecha respecto a la medida realizada a 21°C (Figura 32.B.). Además, los valores de la relación 353/333 nm fueron mucho más altos que las de la apo A-I Z y las rHDL nat, indicando que las rHDL Z son mucho más sensibles a la temperatura que las rHDL nat.

Los ratios 353/333 de desnaturalización para cada temperatura están representados en las gráficas mostradas en la Figura 32.C. En ambos casos, proteína libre y partículas reconstituidas, la apo A-I nat presenta un ajuste lineal, mientras que la apo A-I Z da lugar a una curva con ajuste exponencial.

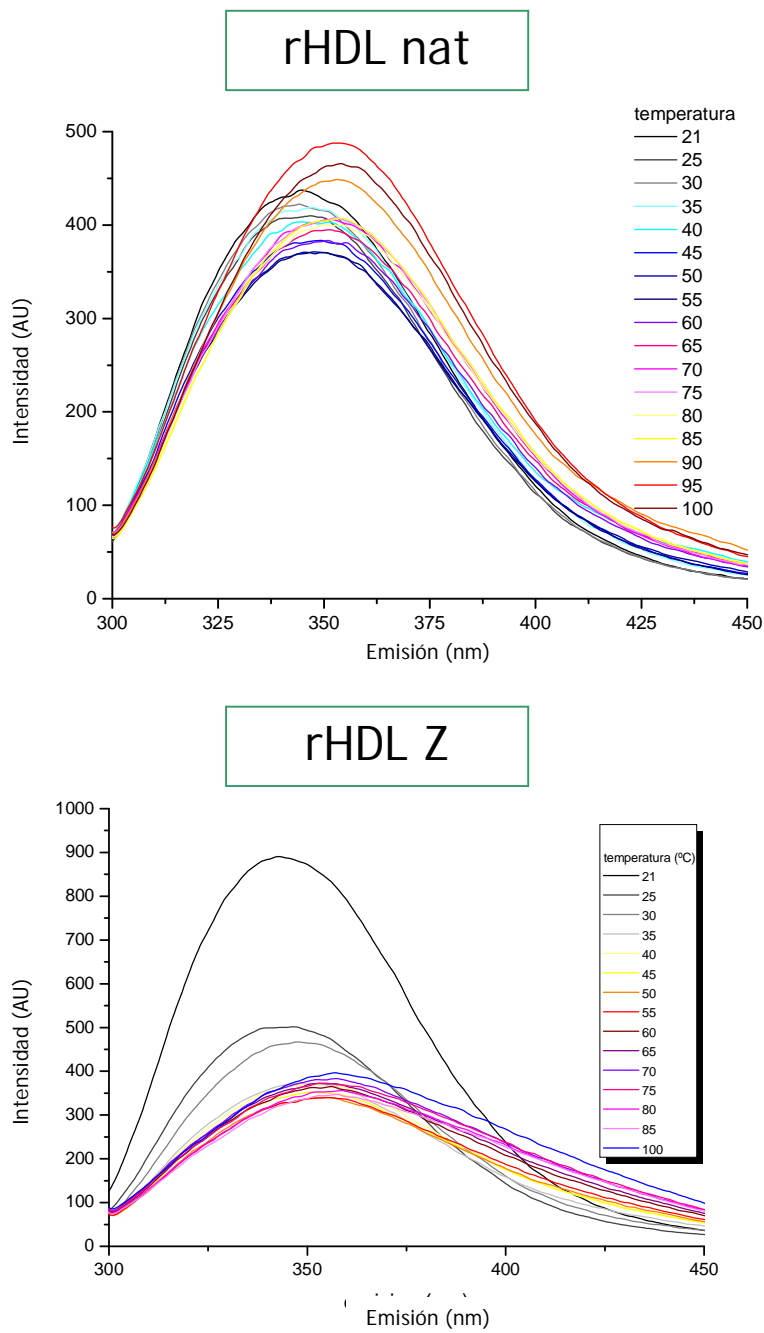
Figura 32. Gráficas representativas de la desnaturalización térmica

A)



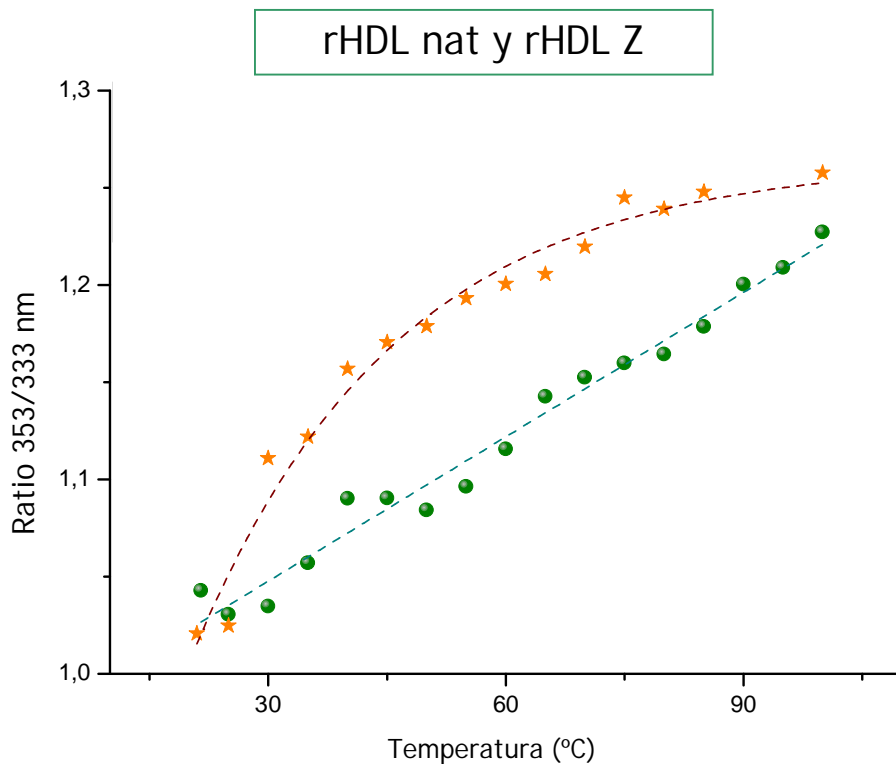
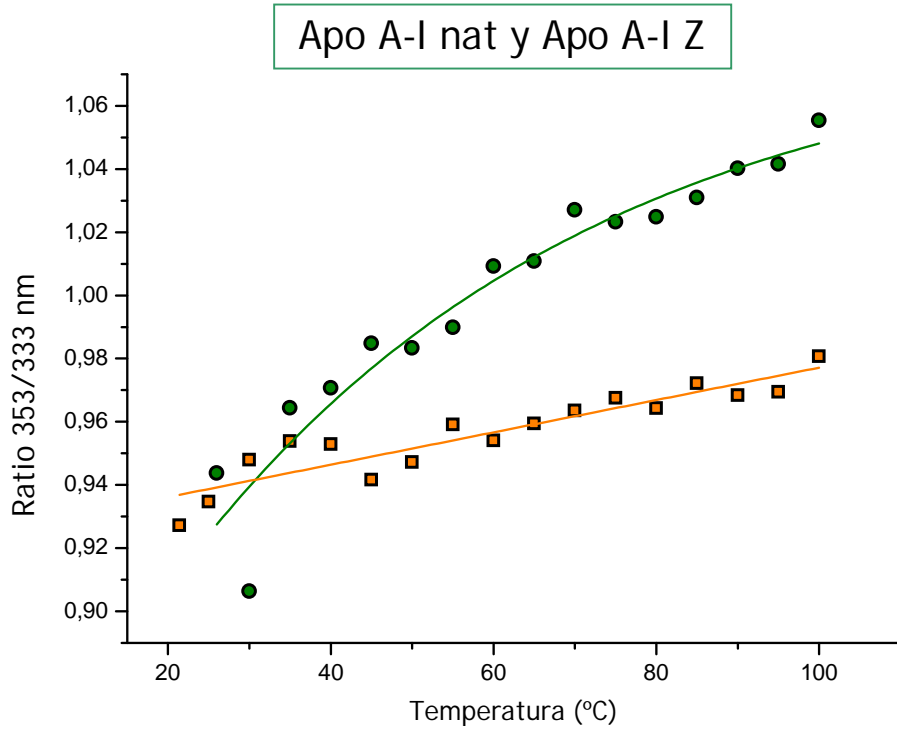
Gráficas representativas de la desnaturalización térmica de la apo A-I nat y Z en forma de proteína libre.

B)



Gráficas representativas de la desnaturalización térmica de la apo A-I nat y Z formando partículas reconstituidas.

C)



Gráficas de los ratios 353/333 de desnaturalización térmica frente a temperatura comparando apo A-I nat y Z tanto en forma libre como formando partículas reconstituidas. Gráfica superior: en color verde esta representado apo A-I nat y en naranja apo A-I Z. Gráfica inferior: en color verde esta representado rHDL nat y en naranja rHDL Z.

4.4.4. Análisis del tamaño de partícula

Mediante el uso de la técnica de dispersión dinámica de luz, se observó diferencias de tamaño de las proteínas apo A-I nat y apo A-I Z en estado libre, indicando la presencia de oligómeros (Tabla 14). Los tamaños obtenidos no eran monodispersos, por lo tanto se representa en la tabla los distintos tamaños con sus proporciones.

Tabla 14. Datos obtenidos de la medición de tamaño de partícula

	Apo A-I nat (nm)	Apo A-I Z (nm)
Muestra original		21.04 (2%)
	18.17 (11%)	24.36 (11%)
	21.04 (33%)	28.21 (27%)
	24.36 (36.5%)	32.67 (30%)
	28.21 (17%)	37.84 (19%)
	32.67 (2.5%)	43.82 (8%)
		50.75 (3%)
Muestra sonicada	15.69 (13%)	
	18.17 (33.5%)	18.17 (13%)
	21.04 (29.5%)	21.04 (35.5%)
	24.36 (13%)	24.36 (34.5%)
	28.21 (5%)	28.21 (14.5%)
	32.67 (3%)	32.67 (2.5%)
	37.84 (3%)	
Muestra diluida y sonicada		13.54 (6.5%)
	21.04 (18%)	15.69 (22%)
	24.36 (42%)	18.17 (31%)
	28.21 (32%)	21.04 (24%)
	32.67 (8%)	24.36 (12%)
		28.21 (4.5%)

4.4.5. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

En una primera aproximación mediante el uso de microscopía electrónica de transmisión se pudo observar partículas reconstituidas con apo A-I Z (Figura 33) y la distribución de tamaños de las partículas calculadas (Figura 34).

Figura 33. Imágenes de rHDL Z obtenida por TEM

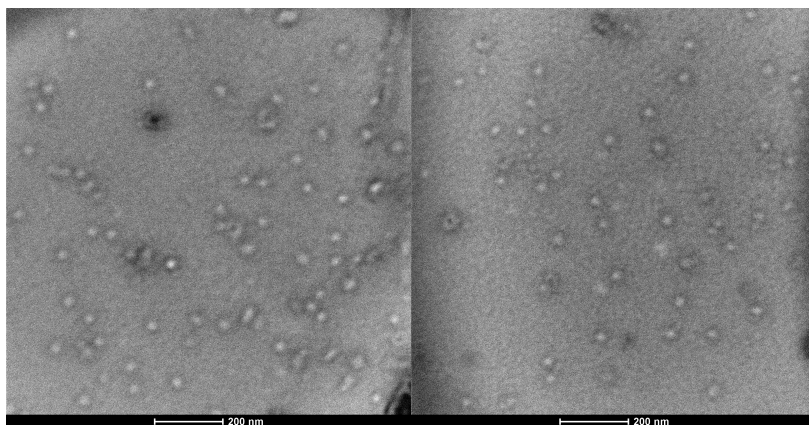
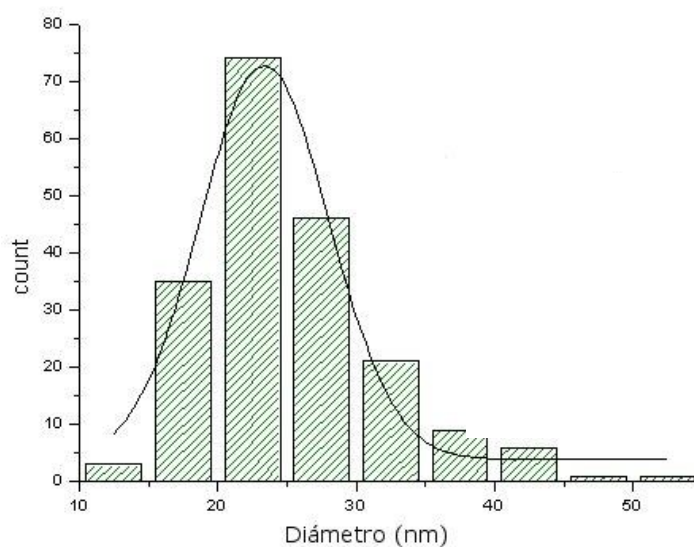


Figura 34. Distribución de tamaños de rHDL Z obtenidas por TEM

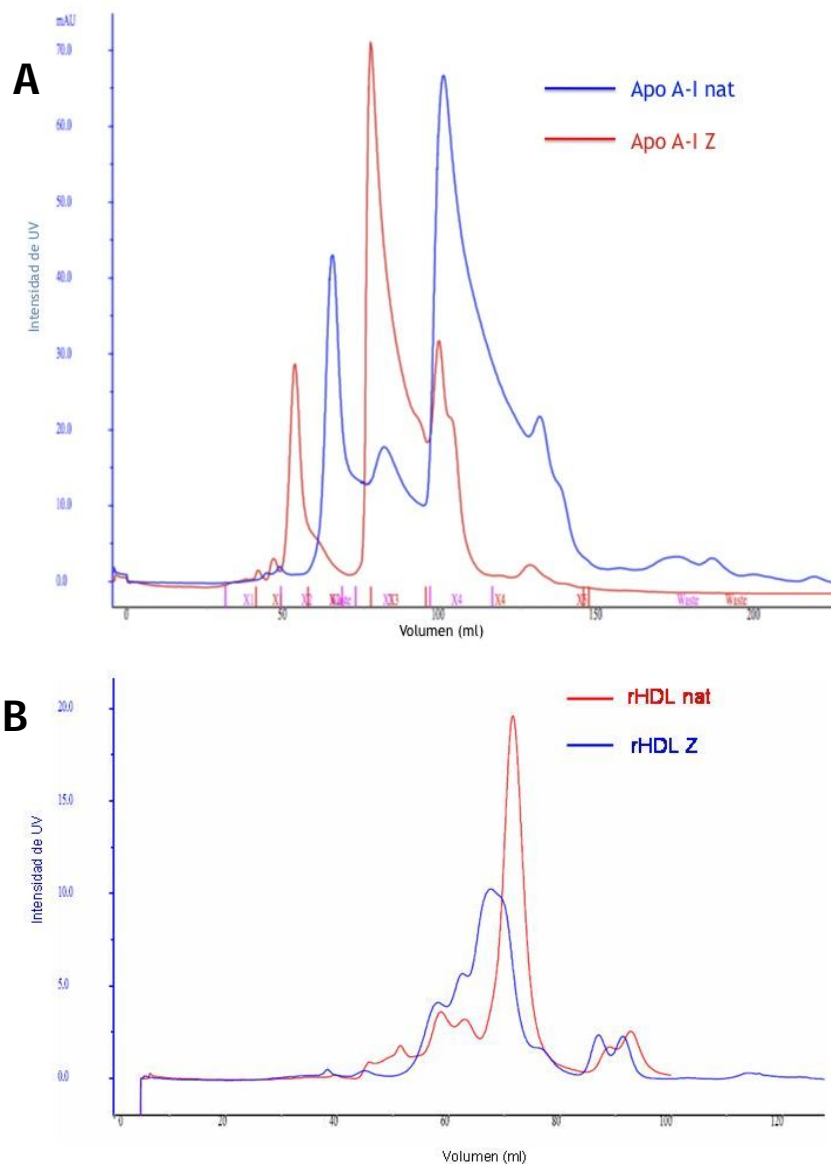


4.4.6. Cromatografía de exclusión molecular

Los perfiles cromatográficos tanto de la apo A-I nat y Z libre, como formando partículas reconstituidas, tenían un patrón similar mostrándose varios picos mayoritarios, algunos solapados entre sí (Figura 35). Estos perfiles de elución sugieren la presencia de diferentes especies conformacionales para las proteínas purificadas en las condiciones analizadas. En el caso de la apo A-I nat también se apreció un pico adicional (Figura 35.A) correspondiente a una especie de mayor tamaño. Los tiempos de elución de ambas proteínas fueron ligeramente distintos, siendo la apo A-I Z más rápida en salir de la columna que la apo A-I nat lo que indicaría un mayor tamaño para la misma. Con el objeto de estudiar si entre las distintas especies observadas en los perfiles de elución podría existir un equilibrio dinámico o se trataba de conformaciones estables, se

recogieron los picos mayoritarios en fracciones separadas. Se permitió su equilibrado a 4°C durante al menos 48h y se concentraron antes de analizarlos de nuevo en las mismas condiciones cromatográficas. El resultado fue que cada fracción dio lugar a un perfil de pico único similar al pico de partida, por lo que se puede rechazar la hipótesis de que exista un equilibrio dinámico rápido entre las especies observadas en los perfiles completos.

Figura 35. Perfiles cromatográficos

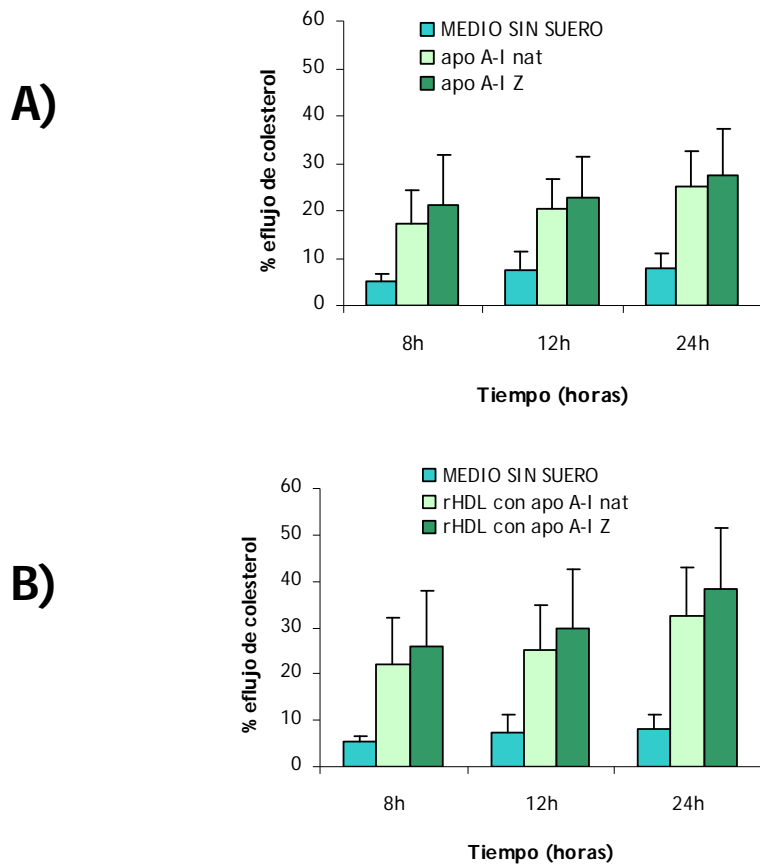


Perfiles cromatográficos: A) Apo A-I nat y Z B) rHDL nat y rHDL Z. En ambos casos la concentración fue de 1mg/ml y se eluyeron a un flujo constante de 0.5 ml/min.

4.4.7. Comparación del eflujo de colesterol promovido por apo A-I nat y apo A-I Z

El eflujo de colesterol fue determinado añadiendo apo A-I libre o partículas reconstituidas tanto para la forma nativa como para la mutante a una concentración de 30µg de proteína por ml como aceptores extracelulares de colesterol a células THP-1 diferenciados a macrófagos de la forma descrita anteriormente (apartado 3.4.2.1). La Figura 36 muestra unos resultados típicos. Los datos muestran media \pm D.E. Se observó una diferencia en el eflujo de colesterol promovido por la apo A-I nat y la apo A-I Z en forma de proteína libre (alrededor de un 2%) siendo más efectiva la apo A-I Z (Figura 36.A). Esta diferencia fue más pronunciada en el caso de las partículas reconstituidas, siendo de nuevo las partículas de apo A-I Z más eficientes (entre 4-6%). Un aumento del eflujo a lo largo del tiempo fue claramente observado en ambos casos, pero en todos los casos las partículas que contenían apo A-I Z promovieron un mayor porcentaje de eflujo de colesterol y fueron más eficiente que las partículas reconstituidas con apo A-I nat (Figura 36.B).

Figura 36. Representación gráfica del porcentaje de eflujo de colesterol en distintas condiciones y tiempos.



Representación gráfica del porcentaje de eflujo de colesterol en distintas condiciones y tiempos. A) Eflujo de colesterol en células THP-1 en presencia de apo A-I libre. El eflujo fue medido de la forma descrita anteriormente (apartado 3.7.) utilizando 30µg/ml apo A-I libre (nat o Z) como aceptor de colesterol extracelular. Los datos muestran media \pm D.E. B) Eflujo de colesterol en células THP-1 dependiente de rHDL. El eflujo fue medido de la forma descrita anteriormente (apartado 3.7.) utilizando 30µg/ml rHDL (nat o Z) como aceptor de colesterol extracelular. Los datos muestran media \pm D.E.

4.4.8. Comparación de la capacidad de cesión de colesterol de partículas reconstituidas con apo A-I nat y apo A-I Z

4.4.8.1. Microscopía de fluorescencia

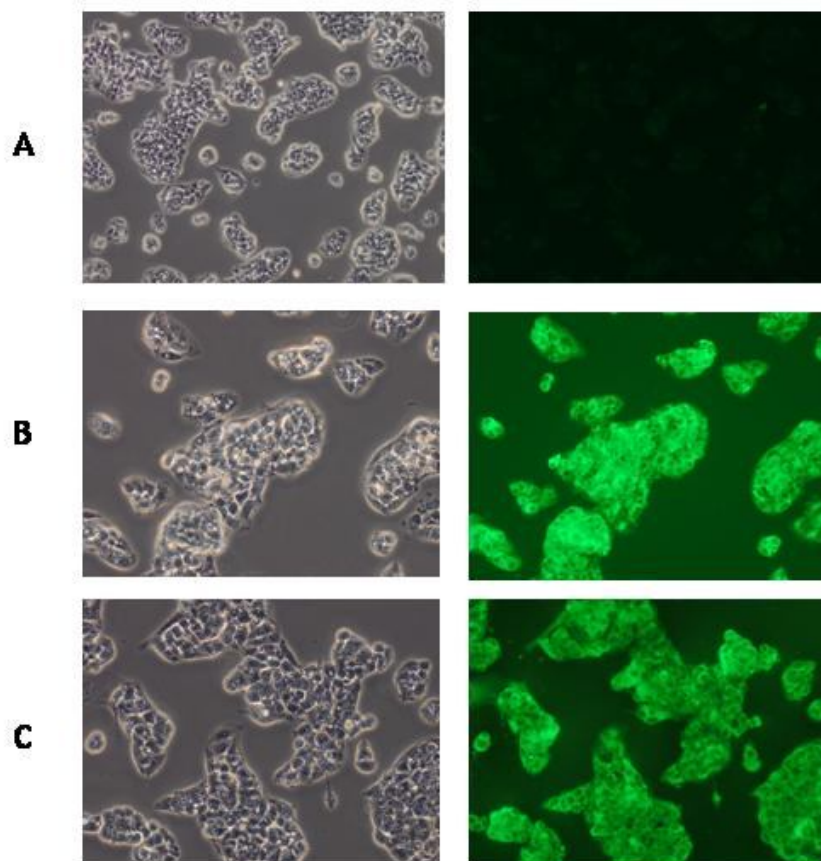
La captación de colesterol fluorescente por células HepG2 incubadas con partículas de apo A-I nat o apo A-I Z fue realizada a una concentración de 35µg proteína/ml durante 4 horas.

La captación del colesterol fluorescente por parte de las células HepG2 fue exitosa, ya que la autofluorescencia de las células control resultó muy baja y requirió largos

tiempos de exposición para ser apreciable y fueron claramente positivos al cultivarlas con partículas cargadas con NBD-colesterol a distintos tiempos. (Figura 37).

Sin embargo esta técnica no reveló diferencias llamativas entre el marcaje de células incubadas con partículas de apo A-I nat o Z y no pudo ser adaptada para poder realizar un análisis cuantitativo de la captación de colesterol por parte de las células.

Figura 37. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células HepG2



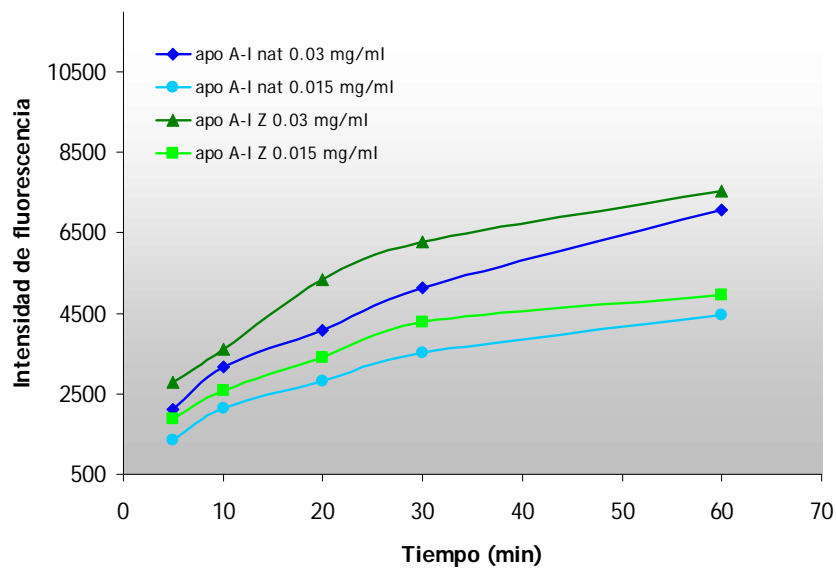
Imágenes de campo claro y microscopía de fluorescencia. Panel A: Células HepG2 control. Panel B: Células HepG2 incubadas con partículas reconstituidas con NBD-colesterol y apo A-I nat. Panel C: Células HepG2 incubadas con partículas reconstituidas con NBC-colesterol y apo A-I Z.

4.4.8.2. Análisis de la captación de colesterol por citometría de flujo

Se midió mediante un procedimiento basado en citometría de flujo la captación de colesterol por parte de células HepG2 como parámetro directamente relacionado con la capacidad de partículas reconstituidas con apo A-I nat o Z para ceder colesterol marcado a nivel hepático.

El patrón de captación a lo largo del tiempo fue dependiente de la concentración de partículas dadoras y alcanzaba la saturación a tiempos superiores a 60 min. Se observó que la cesión de colesterol fue más eficaz desde partículas reconstituidas con apo A-I Z que respecto a apo A-I nat. Esta diferencia es más pronunciada a los 5 min, siendo la diferencia entre ambas de alrededor de un 30% a favor de la apo A-I Z. Esta diferencia se continúa viendo a lo largo del tiempo, aunque va disminuyendo hasta llegar a ser del 8% a los 60 min (Figura 38).

Figura 38. Captación de colesterol por células HepG2 a distintos tiempos y concentraciones.



Representación gráfica de la captación de colesterol por células HepG2 a distintos tiempos y concentraciones medida por citometría de flujo.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

En una población mundial tan afectada por la problemática de las enfermedades cardiovasculares, la necesidad de tratamientos efectivos, seguros y asequibles ha sido y sigue siendo el gran reto de nuestra era.

Lo que en última instancia se trata de encontrar es un tratamiento capaz de curar cualquier afectación cardiovascular independientemente de su causa. Esta idea muy utópica de momento no es posible principalmente debido a la diversidad de causas de la enfermedad cardiovascular. Para poder tratar la enfermedad, primero es necesario entender los mecanismos por los cuales se producen estas disfunciones para así poder actuar sobre ellas y corregirlas en la medida oportuna.

Durante muchos años todos los esfuerzos en este campo se habían centrado en la reducción de la concentración plasmática del c-LDL, considerado el colesterol más aterogénico de nuestro sistema [17, 19]. Después se empezó a enfocar la estrategia de forma distinta, tratando no tanto de bajar los niveles de c-LDL sino de subir la concentración plasmática del c-HDL, ya que se ha demostrado desde hace décadas su relación inversa con la enfermedad cardiovascular, y por lo tanto se considera una partícula ateroprotectora.

Dada la importancia de la HDL por su capacidad protectora frente a la aterosclerosis la búsqueda de nuevas formas de modificarla cuantitativa o cualitativamente se han hecho fundamentales y ha impulsado numerosos estudios en este campo. Un ejemplo claro de este hecho es todo el desarrollo realizado alrededor de la proteína apo A-I Milano descubierta en una población del norte de Italia, Limone Sur Garda y con propiedades ateroprotectoras [204]. Esta proteína ha sido generada de forma recombinante para poder comercializar su uso como fármaco, y se encuentra en las últimas fases de ensayos clínicos en humanos bajo la denominación MDCO-216 (The Medicines Company).

Dada la similitud de los perfiles de los sujetos portadores de apo A-I Milano y apo A-I Z se hipotetizó un mecanismo de acción parecido y unos efectos beneficiosos similares. Esto hace pensar que de forma similar a MDCO-216, el fármaco comercial basado en la apo A-I Milano recombinante, la apo A-I Z podría ser utilizada en un futuro como fármaco antiaterogénico, pero primero es necesario profundizar sobre su mecanismo de acción.

Para poder abordar este objetivo hemos desarrollado un método que nos permite obtener apo A-I nat y apo A-I Z en cantidades y pureza suficiente para poder realizar los

estudios posteriores necesarios, siendo esta la primera vez que se ha producido la apo A-I Z de forma recombinante.

El primer punto a tratar en el diseño fue la elección de un sistema de expresión adecuado. La bibliografía revisada presentaba varios posibles sistemas de expresión para la apolipoproteína A-I y diversas formas mutantes entre los que destacan sistemas procariotas, principalmente *E.coli* [221, 222], levaduras (*Pichia pastoris*) [223] y en algunos casos células eucariotas, en concreto células de ovario de hámster chino (CHO) [224]. También se ha descrito su producción en células de insectos [225] y sistemas vegetales [226, 227]. Cada uno de estos sistemas presenta ventajas y desventajas. Los sistemas de células eucariotas producen la proteína más parecida a la humana, pudiéndose realizar procesos de maduración dentro de la célula, pero presenta el inconveniente de la dificultad de manipulación y, generalmente, un bajo rendimiento.

La producción en levaduras al igual que el sistema de eucariotas da lugar a una proteína procesada de forma parecida a la humana, pero la necesidad de fermentadores a gran escala para obtener buenos rendimientos hace que no sea el sistema más apropiado para nuestro estudio.

El sistema de expresión más utilizado es el de *E.coli*, debido a su eficacia y facilidad de manipulación. Dado que la apo A-I no necesita modificaciones post-traduccionales, hace posible su expresión en células procariotas aunque se debe tener en cuenta que al no producirse la proteólisis de la pre-pro-proteína, es necesario trabajar exclusivamente con la secuencia madura de la apo A-I. Un hecho importante a tener en cuenta es que la eliminación de estos aminoácidos del segmento pre- y pro-proteína hace que la expresión de la proteína baje notablemente. Para rectificar este problema alteramos ciertos codones por otros degenerados de uso más frecuente en *E.coli*, ayudando así a recuperar los niveles de expresión [222].

La incorporación de una cola de histidina a la proteína recombinante facilita su purificación permitiendo el uso cromatografía de afinidad en columnas de níquel para separar la proteína del extracto crudo de lisado bacteriano. Pero también presenta el inconveniente de que la proteína recombinante incorpora en su extremo N-terminal 9 aminoácidos adicionales (MLHHHHHK) que no forman parte de su estructura original y que potencialmente podrían afectar a su estructura y función. Para rectificar este inconveniente es necesario disponer de un sistema de eliminación de la cola de histidina, siendo el procedimiento más empleado el de hidrólisis enzimática. Sin embargo, uno de los problemas más comunes en la manipulación de apo A-I es que a lo

largo de su secuencia es susceptible a la digestión enzimática por numerosas enzimas comúnmente empleadas con este propósito (factor X, enterokinasa, etc).

Distintos trabajos han abordado estrategias variadas para solucionar este problema: (1) creando un sitio de corte para la proteasa de la Ig A (de *Neisseria gonorrhoeae*) o "Igase" [221] que no digiere en la secuencia de apo A-I, (2) creando un enlace adicional en el extremo amino terminal que fuera ácido-lábil [222] o (3) lipidando la proteína antes de usar la enzima [199, 228, 229], impidiendo que la misma no puede atacar a la proteína ya que los lípidos unidos la protegen de la digestión enzimática.

Teniendo en cuenta estos hechos, estudios previos sobre la estructura y función de los diferentes dominios de apo A-I han demostrado que los 43 aminoácidos del extremo N-terminal no están involucrados en la asociación a lípidos [189, 230]. Por lo tanto la incorporación de una cola de histidinas en el extremo N-terminal no debería reducir las funciones de apo A-I. En este sentido Bergeron y col. [230] demostraron que la extensión amino terminal de un péptido formado por la secuencia MRGSHHHHHM en apo A-I humano recombinante no ejerce ningún efecto sobre su capacidad de promover el eflujo de colesterol o la activación de LCAT. Por otra parte, los estudios comparativos de proteínas con cola de histidinas han demostrado un impacto mínimo en las características estructurales determinados por medios cristalográficos [231]. Dado que la cola de histidinas de nuestras proteínas recombinantes están en dicho extremo, pensamos que no se vería afectada la función de la proteína.

Pero en caso de ser necesaria la eliminación de la cola de histidinas, el sistema diseñado permitiría la utilización de la enzima exoproteolítica "*DAPase*", que se puede encontrar de forma comercial bajo el nombre "*Tagzyme*" (Qiagen). "*DAPase*" es una dipeptidil peptidasa recombinante capaz de eliminar dipéptidos de forma secuencial del extremo amino terminal de péptidos y proteínas, dejando de actuar cuando se encuentra con un determinados dipéptidos (K-X, R-X, X-P, X-X X-P)[232]. En nuestro caso su actividad daría lugar a la apo A-I madura con un residuo de lisina adicional en la posición amino terminal.

En términos de purificación y rendimiento nuestro sistema consigue un rendimiento de al menos 30mg por litro de cultivo en fracción soluble tanto para la apo A-I nat como apo A-I Z. Esta cifra sería aun mayor si se tuviera en cuenta la cantidad de proteína retenida en la fracción insoluble. Posiblemente se podría intentar recuperar la proteína de esta fracción aunque presenta mayores problemas de manipulación que la fracción soluble además de correr el riesgo de agregación o degradación de la proteína. Cabe

destacar que la pureza de ambas proteínas, apo A-I nat y apo A-I Z, fue elevada, en torno a 94-93% respectivamente.

Comparando estas cifras con las de otros estudios podemos observar que el rendimiento que hemos conseguido es bueno, y además hay que tener en cuenta la facilidad de manipulación. Sin duda el sistema con el mejor rendimiento es el de la levadura *Pichia pastoris*, pero requiere una instrumentación especializada como es el caso de fermentadores a los cuales no se tiene acceso habitualmente en el ámbito de la investigación, además de emplear un protocolo más largo y laborioso.

El rendimiento de algunos sistemas de *E. coli* también fue superior al nuestro pero como consecuencia de la manipulación genética de numerosos codones en la secuencia codificante, lo que favorece la producción de proteína recombinante [222].

Antes de poder comenzar con los estudios de caracterización fue necesario comprobar que la variante apo A-I Z generada porta correctamente la mutación introducida en el proceso de mutagénesis. Para ello se realizó un análisis mediante espectrometría de masas. Tanto la diferencia en masa apreciada entre la apo A-I nat y Z como los péptidos generados tras la digestión con tripsina confirmó la presencia de la mutación L144R.

Una vez comprobada la presencia correcta de la mutación, se comenzó con el análisis estructural y funcional de las proteínas expresadas. Los experimentos iniciales de caracterización han sido realizados con las dos proteínas recombinantes producidas, permitiendo así la comparación de la apo A-I nat y la variante apo A-I Z. Estos experimentos se han centrado tanto en el análisis del tamaño de ambas proteínas, como en su capacidad de actuar como aceptores o dadores de colesterol. Los experimentos de eflujo y captación por parte de células se llevaron a cabo con partículas de HDL reconstituidas (rHDL) con las dos formas de apo A-I expresadas que incluían fosfolípidos y colesterol. Esto fue necesario porque en condiciones fisiológicas la mayor parte de apo A-I se encuentra formando partículas HDL, por lo que cualquier estudio funcional debe de tener en cuenta este hecho.

La caracterización estructural básica utilizando geles de poliacrilamida no desnaturalizantes reveló una clara diferencia en la movilidad electroforética al comparar la apo A-I nat y Z en forma de proteína libre. Esta diferencia también fue observada al realizar la separación por cromatografía de exclusión molecular y en medidas de dispersión dinámica de la luz. En ambos casos la apo A-I Z presentó menor movilidad electroforética o menor tiempo de elución, aparentemente indicando un mayor tamaño aparente. Esta disparidad podría atribuirse en parte a su diferente punto

isoelectrico (5.81 para la apo A-I nat y 5.92 para la apo A-I Z, según el cálculo teórico con la herramienta “*Compute pI/Mw*” en el servidor ExPASy (http://expasy.org/tools/pi_tool.html)) [233, 234].

Cabe señalar que la diferencia entre los puntos isoelectricos es pequeña y resulta difícil explicar la distinta movilidad observada y, por lo tanto, podría interpretarse como indicador de una diferencia conformacional entre ambas proteínas debida a la presencia de la mutación L144R. Posiblemente la mutación podría producir una estructura más abierta, que dificultaría su paso a través de la matriz de poliacrilamida y por lo tanto reduciría su movilidad electroforética. Este hecho también podría influir en los distintos tiempos de elución observados para cada proteínas al separase por cromatografía de exclusión molecular. Una posible estructura más abierta en el caso de la apo A-I Z, dificultaría su paso por el entramado de la matriz de la columna, dando lugar a tiempos de elución más cortos.

Las diferencias en la movilidad entre las proteínas recombinantes y la apo A-I comercial purificada de plasma es probable que se deba a la presencia de la cola de histidinas en el extremo amino terminal de las proteínas recombinantes, además de su diferente punto isoelectrico que según el cálculo teórico resultaría ser de 5.27 [233, 234]. La presencia de nueve aminoácidos adicionales en el extremo amino terminal de la proteína puede tener un efecto significativo sobre la conformación estructural de las proteínas en su estado libre, afectando por lo tanto su paso a través de la matriz de poliacrilamida debido a los cambios de carga y efectos estéricos [235, 236].

Las partículas reconstituidas también fueron analizadas en geles no desnaturizantes para estudiar su tamaño y homogeneidad. Las partículas rHDL que contienen apo A-I Z fueron ligeramente mayores que las que contenían apo A-I nat; sin embargo las diferencias fueron mínimas comparadas con lo observado para las proteínas en estado libre. Este hecho sugiere que la apo A-I Z es capaz de adoptar una conformación más susceptible de aceptar lípidos. Este hecho también se comprueba al crear partículas reconstituidas utilizando colesterol marcado fluorescentemente (NBD-colesterol). Para la misma cantidad de proteína medida en ambos casos, la medición de fluorescencia en aquellas partículas formadas por apo A-I Z son ligeramente mayores, sugiriendo una mayor capacidad de unión a lípidos.

Tanto la formación de partículas rHDL como los experimentos posteriores de caracterización se llevaron a cabo en presencia de la cola de histidinas, pero como se ha discutido antes, no creemos que haya afectado a su función. No obstante, se ha realizado algún intento inicial de eliminación de la cola de histidina utilizando DAPase

(Tagzyme) con cierto éxito. Se ha conseguido en algunos casos una eliminación parcial de la cola y en otras se ha conseguido eliminarla por completo según análisis de espectrometría de masas, pero se ha observado adicionalmente una degradación variable de la proteína. Actualmente se sigue trabajando en la optimización de este procedimiento.

Al analizar los datos obtenidos del análisis estructural, se observan diferencias notables en la estabilidad térmica entre la apo A-I nat y apo A-I Z, siendo la mutante más sensible a la temperatura. Además la forma de curva de emisión de la apo A-I Z es ligeramente distinta a la de la apo A-I nat, pudiendo indicar una diferencia estructural. El hecho de que la apo A-I Z es más sensible a la temperatura podría interpretarse como la manifestación de una estructura más abierta y por lo tanto más fácilmente accesible al solvente. Estos datos están en conformidad con los resultados observado en geles no desnaturizantes y cromatografía de exclusión molecular. Además, tanto en el análisis del tamaño de partícula como en la cromatografía se ha observado la existencia de oligómeros de la proteína. Si bien a temperaturas inferiores la estabilidad entre ambas proteínas es similar, a temperaturas fisiológicas, la mutante comienza a abrir su estructura en mayor extensión. Todo ello apunta hacia una estructura más abierta de la apo A-I Z comparada con la apo A-I nat, lo que podría afectar a su función y hacerla más accesible a la captación o transporte de lípidos.

Respecto al ensayo de eflujo de colesterol, se utilizó la línea celular THP-1, porque es una línea monocítica que puede ser diferenciada hacia macrófagos, uno de los tipos celulares que participa en la iniciación de la lesión aterosclerótica. Se observó una ligera tendencia de la apo A-I Z para promover más eficientemente el eflujo de colesterol de las células THP-1 comparado con la apo A-I nat, tanto en estado de proteína libre como formando partículas reconstituidas. Sin embargo, estas diferencias que resultaron ser del 4-6% y creemos que son insuficientes para explicar la ateroprotección manifiesta de los portadores de apo A-I Z.

El proceso del transporte reverso de colesterol es una larga y compleja secuencia de eventos que incluye el eflujo, transporte lipídico, captación hepática y catabolismo renal [59, 89]. Por lo tanto se debería asumir que, a pesar de un pequeño aumento en el eflujo de colesterol, la apo A-I Z podría ejercer sus efectos en otras etapas del transporte reverso de colesterol. También es posible que el efecto observado sea específico de las células THP-1 y que tenga distinto efecto en condiciones fisiológicas *in vivo*. Para poder comprobar esto se podrían realizar experimentos utilizando macrófagos humanos derivados de sujetos sanos, para ver si se comportan de forma distinta a las

células THP-1. Pero aun más interesante sería medir su efecto *in vivo* en un modelo animal, para ver si este efecto se puede ver potenciado por otros factores presentes de los sistemas *in vivo*.

Respecto a la captación de colesterol por parte de células HepG2 desde partículas reconstituidas con apo A-I nat o apo A-I Z se realizó una primera aproximación utilizando la visualización a través de microscopio de fluorescencia. Este abordaje puso de manifiesto que las partículas eran capaces de ceder colesterol marcado a las células pero la técnica no fue adecuada para realizar medidas cuantitativas que permitieran comparar objetivamente la capacidad de cesión de colesterol mediada por la forma nativa o la mutante de apo A-I.

Se desarrolló un ensayo basado en el uso de citometría de flujo que permitió la obtención de datos cualitativos que mostraron una diferencia entre la capacidad de donar colesterol marcado a las células HepG2, siendo las partículas generadas con apo A-I Z más efectivas para ello. A lo largo del tiempo se mantiene esta diferencia positiva a favor de la apo A-I Z aunque cada vez se va atenuando dicha diferencia. El valor con mayor diferencia fue a los 5 min de incubación con una diferencia de un 30%, y a medida que pasa el tiempo esta diferencia fue disminuyendo hasta terminar en una diferencia de aproximadamente el 8% a los 60 min. Con este experimento no llegamos a ver lo que podría considerarse el plateau de saturación, ya que continuamos viendo diferencias, pero es posible que a tiempos mayores los valores de ambas proteínas se lleguen a igualar. El hecho de que haya mayor diferencia a tiempos cortos de incubación puede indicar que la velocidad de intercambio de lípidos a nivel hepático es un proceso extremadamente rápido. Si se compara los valores a los 5 min con las del control se ve que en este corto periodo de tiempo, las células llegan a acumular hasta un 25% del colesterol marcado.

Resulta interesante el resultado de captación hepática, que es indicativo de que la apo A-I Z pueda tener otro efecto beneficioso a lo largo del proceso tan complejo que es el transporte reverso de colesterol. El hecho de que la mayor diferencia en capacidad de donar colesterol se haya observado a los tiempos más cortos, es coherente con el dato de que la apo A-I Z tiene una tasa de catabolismo dos veces superior a la nativa [206]. Podría indicar que el efecto beneficioso que posee la apo A-I Z es la de transferir el colesterol a las células hepáticas con mayor velocidad, y por lo tanto renovándose de una forma más rápida. Esto podría producirse con un aumento en su catabolismo.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos de los experimentos de eflujo y captación de colesterol. Sin embargo, aunque los datos observados de eflujo y captación podría

justificar en parte la actividad antiaterogénica de la apo A-I Z, no sabemos si son suficientes para justificar un aumento tan grande de la tasa de catabolismo como la observada, por lo que serán preciso estudiar otras etapas del transporte reverso de colesterol tales como el catabolismo de la apo A-I por vía renal. Es posible que la mutación L144R que contiene la apo A-I Z provoque que la proteína sea más selectivamente catabolizada en el riñón, aumentando así su tasa de catabolismo.

También es necesario tener en consideración que todos los estudios que hemos realizado con la apo A-Z han sido *in vitro* en modelos celulares. Cabe la posibilidad de que en un sistema *in vivo* los efectos no sean los mismos. La partícula de HDL tiene como proteína mayoritaria a la apo A-I, pero también contiene numerosas proteínas minoritarias y cada vez se van descubriendo más [237-239]. Estas proteínas, aunque solo estén presentes en pequeña cantidad, podrían interactuar con la proteína mutada de forma distinta a la proteína nativa, potencialmente aumentando su efecto ateroprotector. Puede que la mutación favorezca la interacción con otras proteínas o moléculas, posiblemente por la estructura más abierta que parece mostrar según los estudios estructurales que hemos realizado, y la combinación de ambas sea la que ejerza un efecto ateroprotector.

Tampoco hay que descartar que la mutación L144R en apo A-I, o los posibles cambios conformacionales inducidos, afecten a la interacción de las HDL portadoras de la forma mutante con las diferentes enzimas que intervienen en el proceso de transporte reverso de colesterol: LCAT, CETP, PLTP, lipasas...etc. Especialmente importante puede ser el efecto de la mutación en la regulación de la actividad de LCAT, ya que se ha descrito que mutaciones que ocurren en la región de la hélice 6 de la apo A-I, desde el residuo 143 hasta la 186, pueden afectar a la actividad de la LCAT porque este dominio es indispensable para su estimulación [201, 240]. Al encontrarse la mutación de la apo A-I Z justo en esta zona, podría explicar parte de su mecanismo de acción. Además, al producirse una sustitución de un amino ácido neutro (Leucina) por otro con carga positiva (Arginina) podría cambiar el microentorno del dominio de unión de manera suficiente para cambiar su actividad, aunque los estudios realizados solo han visto efecto en aquellas sustituciones por amino ácidos negativos [241].

Los estudios con apo A-I Z han sido limitados, pero recientemente se ha publicado un estudio centrado en la unión de la apo A-I Z a la haptoglobina [242]. La haptoglobina es una glicoproteína de fase aguda que secuestra y transporta la hemoglobina libre hacia el hígado [243]. Este trabajo sugiere que la apo A-I Z actúa como un secuestrador de haptoglobina, que a su vez ayuda a protegerla frente a oxidación en situaciones de

estrés. La haptoglobina se une a la apo A-I por el dominio de unión de la LCAT de manera competitiva. La mutación de la apo A-I Z hace que tenga más afinidad por la haptoglobina que por la LCAT, disminuyendo así su actividad. Sin embargo, al quedar "recubierta" por la haptoglobina, la apo A-I Z queda protegida frente a los radicales libres generados en situaciones de inflamación y cuando es necesario se libera de la haptoglobina y puede actuar con normalidad. Todos estos posibles efectos de la apo A-I Z no se pueden estudiar con facilidad en modelos *in vitro* y sería de gran interés realizar experimentos posteriores en modelos *in vivo*.

Otros factores pueden sumarse al efecto ateroprotector de la apo A-I Z debido a modificaciones en otras funciones antiaterogénicas atribuidas a las HDL, como puede ser su capacidad antiinflamatoria o antioxidante [244-246]. Ambos efectos son cruciales para la disminución de la aterosclerosis y si la apo A-I Z tuviera un efecto potenciador de uno o ambos, podría explicar en parte su efecto positivo en sujetos portadores. Hasta el momento no se han realizado estudios de este tipo utilizando la apo A-I Z ni *in vitro* ni *in vivo*, pero sería una vía importante para continuar su caracterización.

La similitud que presenta la apo A-I Z con la apo A-I Milano, respecto a los fenotipos de los sujetos portadores, induce a pensar que su efecto *in vivo* podría ser similar. El mecanismo por el cual la apo A-I Milano ejerce sus efectos ateroprotectores todavía no se ha definido con precisión, pero esto no ha impedido su uso en experimentos tanto *in vitro* como *in vivo* para comprobar su eficacia de forma empírica [208, 247, 248]. En todos los ensayos realizados se ha observado un efecto beneficioso al administrar apo A-I Milano en forma de partículas reconstituidas. Este efecto se manifestaba tanto como un retraso en la evolución de la aterosclerosis, como en algunos casos la reversión del estado de la placa aterosclerótica, llegando a hacerla menos vulnerable [207, 209, 210, 249, 250]. Sería muy interesante realizar experimentos similares utilizando las partículas reconstituidas de la apo A-I Z, para saber si tiene efectos parecidos a los de la apo A-I Milano. La demostración de su efecto beneficioso *in vivo* sería muy importante además de posibilitar una mayor profundización en su mecanismo de acción. Esto, junto con la valoración de los efectos antiinflamatorios y antioxidantes de la apo A-I Z, deberían ser los objetivos siguientes a desarrollar para conseguir un mejor entendimiento de esta proteína mutante tan interesante, y así avanzar en el desarrollo de proteínas terapéuticas que promuevan el transporte reverso de colesterol y potencien las actividades ateroprotectoras naturales de la HDL para atacar el problema de la aterosclerosis.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

Del análisis de los resultados expuestos en el presente trabajo se deducen las siguientes conclusiones:

1. Se han diseñado y obtenido plásmidos de expresión para la apolipoproteína A-I nativa y apolipoproteína A-I Zaragoza que permiten la expresión de ambas proteínas en *E.coli*.
2. Se ha conseguido optimizar un método de expresión y purificación de las proteínas recombinantes apo A-I Zaragoza y apo A-I nativa en *E.coli* con un rendimiento de 30 mg de proteína por litro de cultivo y una pureza del 94%.
3. Se han generado partículas reconstituidas similares a las HDL utilizando fosfolípidos (POPC), colesterol y las proteínas recombinantes apo A-I nativa y apo A-I Zaragoza.
4. Se ha demostrado mediante técnicas de espectrometría de masas que la proteína expresada en ambos casos es la apo A-I y se ha identificado la presencia de la mutación L144R en la apo A-I Zaragoza recombinante.
5. La apo A-I Zaragoza presenta mayor tamaño que la apo A-I nativa en su forma libre y da lugar a partículas reconstituidas también de mayor tamaño. Esta diferencia se ha observado mediante electroforesis en geles no desnaturizante y cromatografía de exclusión molecular.
6. Utilizando la técnica de desnaturalización térmica gradual la apo A-I nat y apo A-I Zaragoza muestran importantes diferencias tanto en estructura como en estabilidad térmica.
7. En un modelo *in vitro* de eflujo de colesterol se ha observado que la apo A-I Zaragoza promueve con mayor eficacia la salida de colesterol de macrófagos en comparación con la apo A-I nativa, tanto en su forma libre como formando partículas HDL reconstituidas, aunque esta diferencia es pequeña (2% y 5% respectivamente).
8. En un modelo *in vitro* de captación de colesterol a nivel hepático se ha observado una mayor eficacia en la cesión de colesterol por parte de partículas HDL reconstituidas con apo A-I Zaragoza en comparación con apo A-I nativa. Esta

diferencia alcanza un 30% en etapas iniciales, aunque en las etapas finales se reduce a un 8%.

REFERENCIAS

7. REFERENCIAS

- [1] Mackay J, Mensah G, The Atlas of Heart Disease and Stroke: WHO, 2004.
- [2] Glass C, Witztum J. Atherosclerosis. the road ahead. Cell 2001; 104:503-516.
- [3] Libby P. Inflammation in atherosclerosis. Nature 2002; 420:868-874.
- [4] Hansson G. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. N Engl J Med 2005; 352:1685-1695.
- [5] Michiels C. Endothelial cell functions. J Cell Physiol 2003; 196:430-443.
- [6] Davies M, Woolf N, Rowles P, Pepper J. Morphology of the endothelium over atherosclerotic plaques in human coronary arteries. Br Heart J 1988; 60:459-464.
- [7] Falk E. Pathogenesis of atherosclerosis. J Am Coll Cardiol 2006; 47:C7-12.
- [8] Kragel A, Reddy S, Wittes J, Roberts W. Morphometric analysis of the composition of atherosclerotic plaques in the four major epicardial coronary arteries in acute myocardial infarction and in sudden coronary death. Circulation 1989; 80:1747-1756.
- [9] Schwartz S, Virmani R, Rosenfeld M. The good smooth muscle cells in atherosclerosis. Curr Atheroscler Rep 2000; 2:422-429.
- [10] Beckman J, Ganz J, Creager M, Ganz P, Kinlay S. Relationship of clinical presentation and calcification of culprit coronary artery stenoses. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2001; 21:1618-1622.
- [11] Kolodgie F, Gold H, Burke A, et al. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. N Engl J Med 2003; 349:2316-2325.
- [12] Virmani R, Kolodgie F, Burke A, et al. Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005; 25:2054-2061.
- [13] Singh R, Mengi S, Xu Y, Arneja A, Dhalla N. Pathogenesis of atherosclerosis: A multifactorial process. Exp Clin Cardiol 2002; 7:40-53.
- [14] Stary HC, Chandler AB, Glagov S, et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. Arterioscler Thromb 1994; 14:840-856.
- [15] Stary H, Chandler A, Dinsmore R, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. Circulation 1995; 92:1355-1374.
- [16] Virchow R, *Cellular Pathology as Based upon Physiological and Pathological Histology*. London: John Churchill, 1860.

- [17] Kannel W, McGee D. Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. *JAMA* 1979; 241:2035-2038.
- [18] Steinberg D. Thematic review series: the pathogenesis of atherosclerosis. An interpretive history of the cholesterol controversy, part V: the discovery of the statins and the end of the controversy. *J Lipid Res* 2006; 47:1339-1351.
- [19] Expert Panel on Detection E, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001; 285:2486-2497.
- [20] Dobrin P. Mechanical factors associated with the development of intimal and medial thickening in vein grafts subjected to arterial pressure. A model of arteries exposed to hypertension. *Hypertension* 1995; 26:38-43.
- [21] Gibbons G, Pratt R, Dzau V. Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. hyperplasia. Autocrine transforming growth factor-beta 1 expression determines growth response to angiotensin II. *J Clin Invest* 1992; 90:456-461.
- [22] Griendling K, Alexander R. Oxidative stress and cardiovascular disease. *Circulation* 1997; 96:3264-3265.
- [23] Lacy F, O'Connor D, Schmid-Schönbein G. Plasma hydrogen peroxide production in hypertensives and normotensive subjects at genetic risk of hypertension. *J Hypertens* 1998; 16:291-303.
- [24] Kabagambe E, Ordovas J, Tsai M, et al. Smoking, inflammatory patterns and postprandial hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis* 2009; 203:633-639.
- [25] Glantz S, Parmley W. Passive smoking and heart disease. Mechanisms and risk. *JAMA* 1995; 273:1047-1053.
- [26] Bazzano L, He J, Muntner P, Vupputuri S, Whelton P. Relationship between cigarette smoking and novel risk factors for cardiovascular disease in the United States. *Ann Intern Med* 2003; 138:891-897.
- [27] Weitz J, Crowley K, Landman S, Lipman B, Yu J. Increased neutrophil elastase activity in cigarette smokers. *Ann Intern Med* 1987; 107:680-682.
- [28] Celermajer D, Sorensen K, Gooch V, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992; 340:1111-1115.
- [29] Tracy R, Toca V, Strong J, Richards M. Relationship of raised atherosclerotic lesions to fatty streaks in cigarette smokers. *Atherosclerosis* 1981; 38:347-357.
- [30] Zieske A, McMahan C, McGill HJ, et al. Smoking is associated with advanced coronary atherosclerosis in youth. *Atherosclerosis* 2005; 180:87-92.

- [31] Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1997; 20:1183-1197.
- [32] Mazzone T, Chait A, Plutzky J. Cardiovascular disease risk in type 2 diabetes mellitus: insights from mechanistic studies. *Lancet* 2008; 371:1800-1809.
- [33] Haffner S, Lehto S, Rönnemaa T, Pyörälä K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med* 1998; 339:229-234.
- [34] Patel A, MacMahon S, Chalmers J, et al. Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2008; 358:2560-2572.
- [35] Kearney P, Blackwell L, Collins R, et al. Efficacy of cholesterol-lowering therapy in 18,686 people with diabetes in 14 randomised trials of statins: a meta-analysis. *Lancet* 2008; 371:117-125.
- [36] Ayyobi A, McGladdery S, McNeely M, Austin M, Motulsky A, Brunzell J. Small, dense LDL and elevated apolipoprotein B are the common characteristics for the three major lipid phenotypes of familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:1289-1294.
- [37] Goldberg I. Clinical review 124: Diabetic dyslipidemia: causes and consequences. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:965-971.
- [38] Ribeiro F, Alves AJ, Duarte JA, Oliveira J. Is exercise training an effective therapy targeting endothelial dysfunction and vascular wall inflammation? *Int J Cardiol* 2010; 141:214-221.
- [39] Hambrecht R, Adams V, Erbs S, et al. Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2003; 107:3152-3158.
- [40] Taylor RS, Brown A, Ebrahim S, et al. Exercise-based rehabilitation for patients with coronary heart disease: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Med* 2004; 116:682-692.
- [41] Walther C, Möbius-Winkler S, Linke A, et al. Regular exercise training compared with percutaneous intervention leads to a reduction of inflammatory markers and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2008; 15:107-112.
- [42] Poirier P, Giles T, Bray G, et al. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26:968-976.
- [43] Ogawa K, Ueda K, Sasaki H, et al. History of obesity as a risk factor for both carotid atherosclerosis and microangiopathy. *Diabetes Res Clin Pract* 2004; 66 Suppl 1:S165-168.

- [44] Zimmet P, Alberti K, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 2001; 414:782-787.
- [45] Eckel R, Grundy S, Zimmet P. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005; 365:1415-1428.
- [46] Pasceri V, Willerson J, Yeh E. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation* 2000; 102:2165-2168.
- [47] Makita S, Nakamura M, Hiramori K. The association of C-reactive protein levels with carotid intima-media complex thickness and plaque formation in the general population. *Stroke* 2005; 36:2138-2142.
- [48] Arner P. The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones. *Trends Endocrinol Metab* 2003; 14:137-145.
- [49] Liuzzo G, Biasucci L, Rebuzzi A, et al. Plasma protein acute-phase response in unstable angina is not induced by ischemic injury. *Circulation* 1996; 94:2373-2380.
- [50] Armstrong E, Morrow D, Sabatine M. Inflammatory biomarkers in acute coronary syndromes: part II: acute-phase reactants and biomarkers of endothelial cell activation. *Circulation* 2006; 113:e152-155.
- [51] Kalin MF, Zumoff B. Sex hormones and coronary disease: a review of the clinical studies. *Steroids* 1990; 55:330-352.
- [52] Jeanes H, Newby D, Gray GA. Cardiovascular risk in women: the impact of hormone replacement therapy and prospects for new therapeutic approaches. *Expert Opin Pharmacother* 2007; 8:279-288.
- [53] Assmann G, Gotto AM. HDL cholesterol and protective factors in atherosclerosis. *Circulation* 2004; 109:III8-14.
- [54] Barr D, Russ E, Eder H. Protein-lipid relationships in human plasma. II. In atherosclerosis and related conditions. *Am J Med* 1951; 11:480-493.
- [55] Miller N, Thelle D, Forde O, Mjos O. The Tromsø heart-study. High-density lipoprotein and coronary heart-disease: a prospective case-control study. *Lancet* 1977; 1:965-968.
- [56] Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 1955; 34:1345-1353.
- [57] Miller G, Miller N. Plasma-high-density-lipoprotein concentration and development of ischaemic heart-disease. *Lancet* 1975; 1:16-19.
- [58] Gordon T, Castelli W, Hjortland M, Kannel W, Dawber T. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med* 1977; 62:707-714.

- [59] Rader D. Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies. *J Clin Invest* 2006; 116:3090-3100.
- [60] Glomset J. The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction. *J Lipid Res* 1968; 9:155-167.
- [61] Ross R, Glomset J. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science* 1973; 180:1332-1339.
- [62] Barter P, Nicholls S, Rye K, Anantharamaiah G, Navab M, Fogelman A. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res* 2004; 95:764-772.
- [63] Mineo C, Deguchi H, Griffin J, Shaul P. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circ Res* 2006; 98:1352-1364.
- [64] Cho K. Biomedical implications of high-density lipoprotein: its composition, structure, functions, and clinical applications. *BMB Rep* 2009; 42:393-400.
- [65] Brewer HJ, Lux S, Ronan R, John K. Amino acid sequence of human apoLp-Gln-II (apoA-II), an apolipoprotein isolated from the high-density lipoprotein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1972; 69:1304-1308.
- [66] Ribas V, Sánchez-Quesada J, Antón R, et al. Human apolipoprotein A-II enrichment displaces paraoxonase from HDL and impairs its antioxidant properties: a new mechanism linking HDL protein composition and antiatherogenic potential. *Circ Res* 2004; 95:789-797.
- [67] Sacks F, Alaupovic P, Moye L, et al. VLDL, apolipoproteins B, CIII, and E, and risk of recurrent coronary events in the Cholesterol and Recurrent Events (CARE) trial. *Circulation* 2000; 102:1886-1892.
- [68] Olin-Lewis K, Benton J, Rutledge J, Baskin D, Wight T, Chait A. Apolipoprotein E mediates the retention of high-density lipoproteins by mouse carotid arteries and cultured arterial smooth muscle cell extracellular matrices. *Circ Res* 2002; 90:1333-1339.
- [69] Jong M, Hofker M, Havekes L. Role of ApoCs in lipoprotein metabolism: functional differences between ApoC1, ApoC2, and ApoC3. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:472-484.
- [70] Cho KH. Synthesis of reconstituted high density lipoprotein (rHDL) containing apoA-I and apoC-III: the functional role of apoC-III in rHDL. *Mol Cells* 2009; 27:291-297.
- [71] Lefevre M, Goudey-Lefevre JC, Roheim PS. Preferential redistribution of lipoprotein-unassociated apoA-IV to an HDL subpopulation with a high degree of LCAT modification. *Lipids* 1989; 24:1035-1038.

- [72] Ostos MA, Conconi M, Vergnes L, et al. Antioxidative and antiatherosclerotic effects of human apolipoprotein A-IV in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:1023-1028.
- [73] Kronenberg F, Stühlinger M, Trenkwalder E, et al. Low apolipoprotein A-IV plasma concentrations in men with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36:751-757.
- [74] Morton R. Cholesteryl ester transfer protein and its plasma regulator: lipid transfer inhibitor protein. *Curr Opin Lipidol* 1999; 10:321-327.
- [75] Brousseau M. Emerging role of high-density lipoprotein in the prevention of cardiovascular disease. *Drug Discov Today* 2005; 10:1095-1101.
- [76] Jauhiainen M, Metso J, Pahlman R, Blomqvist S, van Tol A, Ehnholm C. Human plasma phospholipid transfer protein causes high density lipoprotein conversion. *J Biol Chem* 1993; 268:4032-4036.
- [77] Pussinen P, Jauhiainen M, Metso J, et al. Binding of phospholipid transfer protein (PLTP) to apolipoproteins A-I and A-II: location of a PLTP binding domain in the amino terminal region of apoA-I. *J Lipid Res* 1998; 39:152-161.
- [78] Lagrost L, Athias A, Gambert P, Lallemand C. Comparative study of phospholipid transfer activities mediated by cholesteryl ester transfer protein and phospholipid transfer protein. *J Lipid Res* 1994; 35:825-835.
- [79] Kostner G, Oettl K, Jauhiainen M, Ehnholm C, Esterbauer H, Dieplinger H. Human plasma phospholipid transfer protein accelerates exchange/transfer of alpha-tocopherol between lipoproteins and cells. *Biochem J* 1995; 305 (Pt 2):659-667.
- [80] Tollefson J, Ravnik S, Albers J. Isolation and characterization of a phospholipid transfer protein (LTP-II) from human plasma. *J Lipid Res* 1988; 29:1593-1602.
- [81] Jonas A. Lecithin-cholesterol acyltransferase in the metabolism of high-density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1084:205-220.
- [82] Eckerson H, Wyte C, La Du B. The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am J Hum Genet* 1983; 35:1126-1138.
- [83] Karasawa K. Clinical aspects of plasma platelet-activating factor-acetylhydrolase. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1761:1359-1372.
- [84] Watson A, Navab M, Hama S, et al. Effect of platelet activating factor-acetylhydrolase on the formation and action of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1995; 95:774-782.
- [85] Böttcher A, Schlosser J, Kronenberg F, et al. Preparative free-solution isotachopheresis for separation of human plasma lipoproteins: apolipoprotein and lipid composition of HDL subfractions. *J Lipid Res* 2000; 41:905-915.

- [86] Jenne DE, Lowin B, Peitsch MC, Böttcher A, Schmitz G, Tschopp J. Clusterin (complement lysis inhibitor) forms a high density lipoprotein complex with apolipoprotein A-I in human plasma. *J Biol Chem* 1991; 266:11030-11036.
- [87] Coetzee GA, Strachan AF, van der Westhuyzen DR, Hoppe HC, Jeenah MS, de Beer FC. Serum amyloid A-containing human high density lipoprotein 3. Density, size, and apolipoprotein composition. *J Biol Chem* 1986; 261:9644-9651.
- [88] Hu W, Abe-Dohmae S, Tsujita M, et al. Biogenesis of HDL by SAA is dependent on ABCA1 in the liver in vivo. *J Lipid Res* 2008; 49:386-393.
- [89] Lewis G, Rader D. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ Res* 2005; 96:1221-1232.
- [90] Williamson R, Lee D, Hagan J, Maeda N. Marked reduction of high density lipoprotein cholesterol in mice genetically modified to lack apolipoprotein A-I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89:7134-7138.
- [91] Schaefer EJ, Heaton WH, Wetzel MG, Brewer HB. Plasma apolipoprotein A-1 absence associated with a marked reduction of high density lipoproteins and premature coronary artery disease. *Arteriosclerosis* 1982; 2:16-26.
- [92] Rubin EM, Krauss RM, Spangler EA, Verstuyft JG, Clift SM. Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI. *Nature* 1991; 353:265-267.
- [93] Tangirala RK, Tsukamoto K, Chun SH, Usher D, Puré E, Rader DJ. Regression of atherosclerosis induced by liver-directed gene transfer of apolipoprotein A-I in mice. *Circulation* 1999; 100:1816-1822.
- [94] Weng W, Breslow JL. Dramatically decreased high density lipoprotein cholesterol, increased remnant clearance, and insulin hypersensitivity in apolipoprotein A-II knockout mice suggest a complex role for apolipoprotein A-II in atherosclerosis susceptibility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:14788-14794.
- [95] Rust S, Rosier M, Funke H, et al. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat Genet* 1999; 22:352-355.
- [96] Bodzioch M, Orsó E, Klucken J, et al. The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet* 1999; 22:347-351.
- [97] Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, et al. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet* 1999; 22:336-345.
- [98] Schaefer EJ, Blum CB, Levy RI, et al. Metabolism of high-density lipoprotein apolipoproteins in Tangier disease. *N Engl J Med* 1978; 299:905-910.
- [99] Huuskonen J, Oikkonen VM, Jauhiainen M, Ehnholm C. The impact of phospholipid transfer protein (PLTP) on HDL metabolism. *Atherosclerosis* 2001; 155:269-281.

- [100] Panagotopoulos S, Horace E, Maiorano J, Davidson W. Apolipoprotein A-I adopts a belt-like orientation in reconstituted high density lipoproteins. *J Biol Chem* 2001; 276:42965-42970.
- [101] Segrest JP, Jones MK, Klom AE, et al. A detailed molecular belt model for apolipoprotein A-I in discoidal high density lipoprotein. *J Biol Chem* 1999; 274:31755-31758.
- [102] Marcel YL, Kiss RS. Structure-function relationships of apolipoprotein A-I: a flexible protein with dynamic lipid associations. *Curr Opin Lipidol* 2003; 14:151-157.
- [103] Zannis VI, Chroni A, Krieger M. Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL. *J Mol Med* 2006; 84:276-294.
- [104] Rye KA, Bursill CA, Lambert G, Tabet F, Barter PJ. The metabolism and anti-atherogenic properties of HDL. *J Lipid Res* 2009; 50 Suppl:S195-200.
- [105] Blanche PJ, Gong EL, Forte TM, Nichols AV. Characterization of human high-density lipoproteins by gradient gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta* 1981; 665:408-419.
- [106] Cheung MC, Albers JJ. Characterization of lipoprotein particles isolated by immunoaffinity chromatography. Particles containing A-I and A-II and particles containing A-I but no A-II. *J Biol Chem* 1984; 259:12201-12209.
- [107] Castro GR, Fielding CJ. Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre-beta-migrating high-density lipoprotein. *Biochemistry* 1988; 27:25-29.
- [108] Khera AV, Rader DJ. Future therapeutic directions in reverse cholesterol transport. *Curr Atheroscler Rep* 2010; 12:73-81.
- [109] Tall AR, Wang N, Mucksavage P. Is it time to modify the reverse cholesterol transport model? *J Clin Invest* 2001; 108:1273-1275.
- [110] Cuchel M, Rader DJ. Macrophage reverse cholesterol transport: key to the regression of atherosclerosis? *Circulation* 2006; 113:2548-2555.
- [111] Repa JJ, Mangelsdorf DJ. The liver X receptor gene team: potential new players in atherosclerosis. *Nat Med* 2002; 8:1243-1248.
- [112] Wang N, Lan D, Chen W, Matsuura F, Tall AR. ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:9774-9779.
- [113] Kennedy MA, Barrera GC, Nakamura K, et al. ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab* 2005; 1:121-131.
- [114] Haghpassand M, Bourassa PA, Francone OL, Aiello RJ. Monocyte/macrophage expression of ABCA1 has minimal contribution to plasma HDL levels. *J Clin Invest* 2001; 108:1315-1320.

- [115] Lee JY, Parks JS. ATP-binding cassette transporter AI and its role in HDL formation. *Curr Opin Lipidol* 2005; 16:19-25.
- [116] Basso F, Freeman L, Knapper CL, et al. Role of the hepatic ABCA1 transporter in modulating intrahepatic cholesterol and plasma HDL cholesterol concentrations. *J Lipid Res* 2003; 44:296-302.
- [117] Wellington CL, Brunham LR, Zhou S, et al. Alterations of plasma lipids in mice via adenoviral-mediated hepatic overexpression of human ABCA1. *J Lipid Res* 2003; 44:1470-1480.
- [118] Vaisman BL, Lambert G, Amar M, et al. ABCA1 overexpression leads to hyperalphalipoproteinemia and increased biliary cholesterol excretion in transgenic mice. *J Clin Invest* 2001; 108:303-309.
- [119] Brewer HB, Santamarina-Fojo S. New insights into the role of the adenosine triphosphate-binding cassette transporters in high-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport. *Am J Cardiol* 2003; 91:3E-11E.
- [120] Singaraja RR, Fievet C, Castro G, et al. Increased ABCA1 activity protects against atherosclerosis. *J Clin Invest* 2002; 110:35-42.
- [121] Rothblat GH, de la Llera-Moya M, Atger V, Kellner-Weibel G, Williams DL, Phillips MC. Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights. *J Lipid Res* 1999; 40:781-796.
- [122] Rye KA, Barter PJ. Formation and metabolism of prebeta-migrating, lipid-poor apolipoprotein A-I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:421-428.
- [123] Qiu X, Mistry A, Ammirati MJ, et al. Crystal structure of cholesteryl ester transfer protein reveals a long tunnel and four bound lipid molecules. *Nat Struct Mol Biol* 2007; 14:106-113.
- [124] Clay MA, Newnham HH, Barter PJ. Hepatic lipase promotes a loss of apolipoprotein A-I from triglyceride-enriched human high density lipoproteins during incubation in vitro. *Arterioscler Thromb* 1991; 11:415-422.
- [125] Rye KA, Hime NJ, Barter PJ. Evidence that cholesteryl ester transfer protein-mediated reductions in reconstituted high density lipoprotein size involve particle fusion. *J Biol Chem* 1997; 272:3953-3960.
- [126] Settasatian N, Duong M, Curtiss LK, et al. The mechanism of the remodeling of high density lipoproteins by phospholipid transfer protein. *J Biol Chem* 2001; 276:26898-26905.
- [127] Jaye M, Lynch KJ, Krawiec J, et al. A novel endothelial-derived lipase that modulates HDL metabolism. *Nat Genet* 1999; 21:424-428.

- [128] Jahangiri A, Rader DJ, Marchadier D, Curtiss LK, Bonnet DJ, Rye KA. Evidence that endothelial lipase remodels high density lipoproteins without mediating the dissociation of apolipoprotein A-I. *J Lipid Res* 2005; 46:896-903.
- [129] Saddar S, Mineo C, Shaul PW. Signaling by the high-affinity HDL receptor scavenger receptor B type I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30:144-150.
- [130] Silver DL, Wang N, Xiao X, Tall AR. High density lipoprotein (HDL) particle uptake mediated by scavenger receptor class B type 1 results in selective sorting of HDL cholesterol from protein and polarized cholesterol secretion. *J Biol Chem* 2001; 276:25287-25293.
- [131] Kozarsky KF, Donahue MH, Rigotti A, Iqbal SN, Edelman ER, Krieger M. Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels. *Nature* 1997; 387:414-417.
- [132] Rigotti A, Trigatti BL, Penman M, Rayburn H, Herz J, Krieger M. A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:12610-12615.
- [133] Brundert M, Ewert A, Heeren J, et al. Scavenger receptor class B type I mediates the selective uptake of high-density lipoprotein-associated cholesteryl ester by the liver in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:143-148.
- [134] Zhang Y, Da Silva JR, Reilly M, Billheimer JT, Rothblat GH, Rader DJ. Hepatic expression of scavenger receptor class B type I (SR-BI) is a positive regulator of macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *J Clin Invest* 2005; 115:2870-2874.
- [135] Brown ML, Inazu A, Hesler CB, et al. Molecular basis of lipid transfer protein deficiency in a family with increased high-density lipoproteins. *Nature* 1989; 342:448-451.
- [136] Inazu A, Brown ML, Hesler CB, et al. Increased high-density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl-ester transfer protein gene mutation. *N Engl J Med* 1990; 323:1234-1238.
- [137] Ikewaki K, Rader DJ, Sakamoto T, et al. Delayed catabolism of high density lipoprotein apolipoproteins A-I and A-II in human cholesteryl ester transfer protein deficiency. *J Clin Invest* 1993; 92:1650-1658.
- [138] Barter PJ, Caulfield M, Eriksson M, et al. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N Engl J Med* 2007; 357:2109-2122.
- [139] Miyares MA. Anacetrapib and dalcetrapib: two novel cholesteryl ester transfer protein inhibitors. *Ann Pharmacother* 2011; 45:84-94.

- [140] Navab M, Hama SY, Cooke CJ, et al. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1. *J Lipid Res* 2000; 41:1481-1494.
- [141] Navab M, Hama SY, Anantharamaiah GM, et al. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3. *J Lipid Res* 2000; 41:1495-1508.
- [142] Navab M, Berliner JA, Subbanagounder G, et al. HDL and the inflammatory response induced by LDL-derived oxidized phospholipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:481-488.
- [143] Shih DM, Xia YR, Wang XP, et al. Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *J Biol Chem* 2000; 275:17527-17535.
- [144] Tward A, Xia YR, Wang XP, et al. Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice. *Circulation* 2002; 106:484-490.
- [145] Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V, et al. Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:542-547.
- [146] Garner B, Waldeck AR, Witting PK, Rye KA, Stocker R. Oxidation of high density lipoproteins. II. Evidence for direct reduction of lipid hydroperoxides by methionine residues of apolipoproteins AI and AII. *J Biol Chem* 1998; 273:6088-6095.
- [147] Cockerill GW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15:1987-1994.
- [148] Calabresi L, Franceschini G, Sirtori CR, et al. Inhibition of VCAM-1 expression in endothelial cells by reconstituted high density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 238:61-65.
- [149] Park SH, Park JH, Kang JS, Kang YH. Involvement of transcription factors in plasma HDL protection against TNF-alpha-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35:168-182.
- [150] Mackness B, Hine D, Liu Y, Mastorikou M, Mackness M. Paraoxonase-1 inhibits oxidised LDL-induced MCP-1 production by endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 318:680-683.
- [151] Navab M, Imes SS, Hama SY, et al. Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in cocultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemoattractant protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein. *J Clin Invest* 1991; 88:2039-2046.

- [152] Murphy AJ, Woollard KJ, Hoang A, et al. High-density lipoprotein reduces the human monocyte inflammatory response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28:2071-2077.
- [153] Shah PK, Kaul S, Nilsson J, Cercek B. Exploiting the vascular protective effects of high-density lipoprotein and its apolipoproteins: an idea whose time for testing is coming, part II. *Circulation* 2001; 104:2498-2502.
- [154] Assmann G, Nofer JR. Atheroprotective effects of high-density lipoproteins. *Annu Rev Med* 2003; 54:321-341.
- [155] Fleisher LN, Tall AR, Witte LD, Miller RW, Cannon PJ. Stimulation of arterial endothelial cell prostacyclin synthesis by high density lipoproteins. *J Biol Chem* 1982; 257:6653-6655.
- [156] Spector AA, Scanu AM, Kaduce TL, Figard PH, Fless GM, Czervionke RL. Effect of human plasma lipoproteins on prostacyclin production by cultured endothelial cells. *J Lipid Res* 1985; 26:288-297.
- [157] Vane JR, Botting RM. Pharmacodynamic profile of prostacyclin. *Am J Cardiol* 1995; 75:3A-10A.
- [158] Wadham C, Albanese N, Roberts J, et al. High-density lipoproteins neutralize C-reactive protein proinflammatory activity. *Circulation* 2004; 109:2116-2122.
- [159] Bombeli T, Karsan A, Tait JF, Harlan JM. Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant. *Blood* 1997; 89:2429-2442.
- [160] Bombeli T, Schwartz BR, Harlan JM. Endothelial cells undergoing apoptosis become proadhesive for nonactivated platelets. *Blood* 1999; 93:3831-3838.
- [161] Mallat Z, Tedgui A. Current perspective on the role of apoptosis in atherothrombotic disease. *Circ Res* 2001; 88:998-1003.
- [162] Griffin JH, Kojima K, Banka CL, Curtiss LK, Fernández JA. High-density lipoprotein enhancement of anticoagulant activities of plasma protein S and activated protein C. *J Clin Invest* 1999; 103:219-227.
- [163] Nicholls SJ, Cutri B, Worthley SG, et al. Impact of short-term administration of high-density lipoproteins and atorvastatin on atherosclerosis in rabbits. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2005; 25:2416-2421.
- [164] O'Connell BJ, Genest J. High-density lipoproteins and endothelial function. *Circulation* 2001; 104:1978-1983.
- [165] Ridker PM, Brown NJ, Vaughan DE, Harrison DG, Mehta JL. Established and emerging plasma biomarkers in the prediction of first atherothrombotic events. *Circulation* 2004; 109:IV6-19.

- [166] Pajkrt D, Lerch PG, van der Poll T, et al. Differential effects of reconstituted high-density lipoprotein on coagulation, fibrinolysis and platelet activation during human endotoxemia. *Thromb Haemost* 1997; 77:303-307.
- [167] Li D, Weng S, Yang B, et al. Inhibition of arterial thrombus formation by ApoA1 Milano. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:378-383.
- [168] Lerch PG, Spycher MO, Doran JE. Reconstituted high density lipoprotein (rHDL) modulates platelet activity in vitro and ex vivo. *Thromb Haemost* 1998; 80:316-320.
- [169] Cayatte AJ, Palacino JJ, Horten K, Cohen RA. Chronic inhibition of nitric oxide production accelerates neointima formation and impairs endothelial function in hypercholesterolemic rabbits. *Arterioscler Thromb* 1994; 14:753-759.
- [170] Cohen RA. The role of nitric oxide and other endothelium-derived vasoactive substances in vascular disease. *Prog Cardiovasc Dis* 1995; 38:105-128.
- [171] Blair A, Shaul PW, Yuhanna IS, Conrad PA, Smart EJ. Oxidized low density lipoprotein displaces endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) from plasmalemmal caveolae and impairs eNOS activation. *J Biol Chem* 1999; 274:32512-32519.
- [172] Uittenbogaard A, Shaul PW, Yuhanna IS, Blair A, Smart EJ. High density lipoprotein prevents oxidized low density lipoprotein-induced inhibition of endothelial nitric-oxide synthase localization and activation in caveolae. *J Biol Chem* 2000; 275:11278-11283.
- [173] Ou J, Wang J, Xu H, et al. Effects of D-4F on vasodilation and vessel wall thickness in hypercholesterolemic LDL receptor-null and LDL receptor/apolipoprotein A-I double-knockout mice on Western diet. *Circ Res* 2005; 97:1190-1197.
- [174] Ou J, Ou Z, Jones DW, et al. L-4F, an apolipoprotein A-1 mimetic, dramatically improves vasodilation in hypercholesterolemia and sickle cell disease. *Circulation* 2003; 107:2337-2341.
- [175] Ou Z, Ou J, Ackerman AW, Oldham KT, Pritchard KA. L-4F, an apolipoprotein A-1 mimetic, restores nitric oxide and superoxide anion balance in low-density lipoprotein-treated endothelial cells. *Circulation* 2003; 107:1520-1524.
- [176] Mineo C, Yuhanna IS, Quon MJ, Shaul PW. High density lipoprotein-induced endothelial nitric-oxide synthase activation is mediated by Akt and MAP kinases. *J Biol Chem* 2003; 278:9142-9149.
- [177] Rämetsä ME, Rämetsä M, Lu Q, et al. High-density lipoprotein increases the abundance of eNOS protein in human vascular endothelial cells by increasing its half-life. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41:2288-2297.
- [178] Tauber JP, Cheng J, Gospodarowicz D. Effect of high and low density lipoproteins on proliferation of cultured bovine vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1980; 66:696-708.

- [179] Tauber JP, Cheng J, Massoglia S, Gospodarowicz D. High density lipoproteins and the growth of vascular endothelial cells in serum-free medium. *In Vitro* 1981; 17:519-530.
- [180] Tamagaki T, Sawada S, Imamura H, et al. Effects of high-density lipoproteins on intracellular pH and proliferation of human vascular endothelial cells. *Atherosclerosis* 1996; 123:73-82.
- [181] Seetharam D, Mineo C, Gormley AK, et al. High-density lipoprotein promotes endothelial cell migration and reendothelialization via scavenger receptor-B type I. *Circ Res* 2006; 98:63-72.
- [182] Suc I, Escargueil-Blanc I, Trolly M, Salvayre R, Nègre-Salvayre A. HDL and ApoA prevent cell death of endothelial cells induced by oxidized LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:2158-2166.
- [183] Sugano M, Tsuchida K, Makino N. High-density lipoproteins protect endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 272:872-876.
- [184] Brouillette CG, Anantharamaiah GM, Engler JA, Borhani DW. Structural models of human apolipoprotein A-I: a critical analysis and review. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* 2001; 1531:4-46.
- [185] Davidson WS, Thompson TB. The structure of apolipoprotein A-I in high density lipoproteins. *Journal of Biological Chemistry* 2007; 282:22249-22253.
- [186] Gordon JI, Sims HF, Lentz SR, Edelstein C, Scanu AM, Strauss AW. Proteolytic processing of human preproapolipoprotein A-I. A proposed defect in the conversion of pro A-I to A-I in Tangier's disease. *J Biol Chem* 1983; 258:4037-4044.
- [187] Saku K, von Eckardstein A, Zhang B, et al. In vivo kinetics of human apolipoprotein A-I variants in rabbits. *Eur J Clin Invest* 1999; 29:196-203.
- [188] Segrest JP, Jones MK, De Loof H, Brouillette CG, Venkatachalapathi YV, Anantharamaiah GM. The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function. *J Lipid Res* 1992; 33:141-166.
- [189] Palgunachari M, Mishra V, Lund-Katz S, et al. 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* 1996; 16:328-338.
- [190] Frank PG, N'Guyen D, Franklin V, et al. Importance of central alpha-helices of human apolipoprotein A-I in the maturation of high-density lipoproteins. *Biochemistry* 1998; 37:13902-13909.
- [191] Roosbeek S, Vanloo B, Duverger N, et al. Three arginine residues in apolipoprotein A-I are critical for activation of lecithin:cholesterol acyltransferase. *J Lipid Res* 2001; 42:31-40.

- [192] McManus DC, Scott BR, Frank PG, Franklin V, Schultz JR, Marcel YL. Distinct central amphipathic alpha-helices in apolipoprotein A-I contribute to the in vivo maturation of high density lipoprotein by either activating lecithin-cholesterol acyltransferase or binding lipids. *J Biol Chem* 2000; 275:5043-5051.
- [193] Saito H, Dhanasekaran P, Nguyen D, Holvoet P, Lund-Katz S, Phillips MC. Domain structure and lipid interaction in human apolipoproteins A-I and E, a general model. *J Biol Chem* 2003; 278:23227-23232.
- [194] Saito H, Dhanasekaran P, Nguyen D, et al. Alpha-helix formation is required for high affinity binding of human apolipoprotein A-I to lipids. *J Biol Chem* 2004; 279:20974-20981.
- [195] Burgess JW, Frank PG, Franklin V, et al. Deletion of the C-terminal domain of apolipoprotein A-I impairs cell surface binding and lipid efflux in macrophage. *Biochemistry* 1999; 38:14524-14533.
- [196] Sviridov D, Pyle LE, Fidge N. Efflux of cellular cholesterol and phospholipid to apolipoprotein A-I mutants. *J Biol Chem* 1996; 271:33277-33283.
- [197] Maiorano JN, Jandacek RJ, Horace EM, Davidson WS. Identification and structural ramifications of a hinge domain in apolipoprotein A-I discoidal high-density lipoproteins of different size. *Biochemistry* 2004; 43:11717-11726.
- [198] Silva RA, Hilliard GM, Li L, Segrest JP, Davidson WS. A mass spectrometric determination of the conformation of dimeric apolipoprotein A-I in discoidal high density lipoproteins. *Biochemistry* 2005; 44:8600-8607.
- [199] Miller M, Aiello D, Pritchard H, Friel G, Zeller K. Apolipoprotein A-I(Zavalla) (Leu159-->Pro): HDL cholesterol deficiency in a kindred associated with premature coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18:1242-1247.
- [200] Hovingh G, Brownlie A, Bisioendial R, et al. A novel apoA-I mutation (L178P) leads to endothelial dysfunction, increased arterial wall thickness, and premature coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44:1429-1435.
- [201] Sorci-Thomas M, Thomas M. The effects of altered apolipoprotein A-I structure on plasma HDL concentration. *Trends Cardiovasc Med* 2002; 12:121-128.
- [202] Miettinen H, Jauhiainen M, Gylling H, et al. Apolipoprotein A-I FIN (Leu159-->Arg) mutation affects lecithin cholesterol acyltransferase activation and subclass distribution of HDL but not cholesterol efflux from fibroblasts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:3021-3032.
- [203] Huang W, Sasaki J, Matsunaga A, et al. A novel homozygous missense mutation in the apo A-I gene with apo A-I deficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18:389-396.

- [204] Franceschini G, Sirtori C, Capurso An, Weisgraber K, Mahley R. A-IMilano apoprotein. Decreased high density lipoprotein cholesterol levels with significant lipoprotein modifications and without clinical atherosclerosis in an Italian family. *J Clin Invest* 1980; 66:892-900.
- [205] Bruckert E, von Eckardstein A, Funke H, et al. The replacement of arginine by cysteine at residue 151 in apolipoprotein A-I produces a phenotype similar to that of apolipoprotein A-IMilano. *Atherosclerosis* 1997; 128:121-128.
- [206] Recalde D, Velez-Carrasco W, Civeira F, et al. Enhanced fractional catabolic rate of apo A-I and apo A-II in heterozygous subjects for apo A-I(Zaragoza) (L144R). *Atherosclerosis* 2001; 154:613-623.
- [207] Ameli S, Hultgardh-Nilsson A, Cercek B, et al. Recombinant apolipoprotein A-I Milano reduces intimal thickening after balloon injury in hypercholesterolemic rabbits. *Circulation* 1994; 90:1935-1941.
- [208] Shah P, Nilsson J, Kaul S, et al. Effects of recombinant apolipoprotein A-I(Milano) on aortic atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 1998; 97:780-785.
- [209] Nicholls S, Tuzcu E, Sipahi I, et al. Relationship between atheroma regression and change in lumen size after infusion of apolipoprotein A-I Milano. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47:992-997.
- [210] Nissen S, Tsunoda T, Tuzcu E, et al. Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial. *JAMA* 2003; 290:2292-2300.
- [211] Navab M, Anantharamaiah G, Hama S, et al. Oral administration of an Apo A-I mimetic Peptide synthesized from D-amino acids dramatically reduces atherosclerosis in mice independent of plasma cholesterol. *Circulation* 2002; 105:290-292.
- [212] Navab M, Anantharamaiah G, Reddy S, et al. Oral D-4F causes formation of pre-beta high-density lipoprotein and improves high-density lipoprotein-mediated cholesterol efflux and reverse cholesterol transport from macrophages in apolipoprotein E-null mice. *Circulation* 2004; 109:3215-3220.
- [213] Ko JK, Ma J. A rapid and efficient PCR-based mutagenesis method applicable to cell physiology study. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 288:C1273-1278.
- [214] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.
- [215] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254.

- [216] Gwynne J, Brewer B, Edelhoch H. The molecular properties of ApoA-I from human high density lipoprotein. *J Biol Chem* 1974; 249:2411-2416.
- [217] Cavigiolio G, Shao B, Geier E, Ren G, Heinecke J, Oda M. The interplay between size, morphology, stability, and functionality of high-density lipoprotein subclasses. *Biochemistry* 2008; 47:4770-4779.
- [218] Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 1980; 26:171-176.
- [219] Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 1979; 282:615-616.
- [220] Tricerri A, Córscico B, Toledo JD, Garda HA, Brenner RR. Conformation of apolipoprotein AI in reconstituted lipoprotein particles and particle-membrane interaction: effect of cholesterol. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1391:67-78.
- [221] Panagotopoulos S, Witting S, Horace E, Nicholas Maiorano J, Sean Davidson W. Bacterial expression and characterization of mature apolipoprotein A-I. *Protein Expr Purif* 2002; 25:353-361.
- [222] Ryan R, Forte T, Oda M. Optimized bacterial expression of human apolipoprotein A-I. *Protein Expr Purif* 2003; 27:98-103.
- [223] Feng M, Cai Q, Song D, Dong J, Zhou P. High yield and secretion of recombinant human apolipoprotein AI in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* 2006; 46:337-342.
- [224] Mallory J, Kushner P, Protter A, et al. Expression and characterization of human apolipoprotein A-I in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1987; 262:4241-4247.
- [225] Pyle LE, Barton P, Fujiwara Y, Mitchell A, Fidge N. Secretion of biologically active human proapolipoprotein A-I in a baculovirus-insect cell system: protection from degradation by protease inhibitors. *J Lipid Res* 1995; 36:2355-2361.
- [226] Nykiforuk CL, Shen Y, Murray EW, et al. Expression and recovery of biologically active recombinant Apolipoprotein AI(Milano) from transgenic safflower (*Carthamus tinctorius*) seeds. *Plant Biotechnol J* 2011; 9:250-263.
- [227] Chiaiese P, Minutolo M, Arciello A, Guglielmini F, Piccoli R, Filippone E. Expression of human apolipoprotein A-I in *Nicotiana tabacum*. *Biotechnol Lett* 2011; 33:159-165.
- [228] Cho K, Jonas A. A key point mutation (V156E) affects the structure and functions of human apolipoprotein A-I. *J Biol Chem* 2000; 275:26821-26827.
- [229] Han J, Jeong T, Lee W, Choi I, Cho K. Structural and functional properties of V156K and A158E mutants of apolipoprotein A-I in the lipid-free and lipid-bound states. *J Lipid Res* 2005; 46:589-596.

- [230] Bergeron J, Frank PG, Emmanuel F, et al. Characterization of human apolipoprotein A-I expressed in *Escherichia coli*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism* 1997; 1344:139-152.
- [231] Carson M, Johnson DH, McDonald H, Brouillette C, Delucas LJ. His-tag impact on structure. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2007; 63:295-301.
- [232] Schäfer F, Schäfer A, Steinert K. A highly specific system for efficient enzymatic removal of tags from recombinant proteins. *J Biomol Tech* 2002; 13:158-171.
- [233] Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, et al., *The Proteomics Protocols Handbook*: Humana Press, 2005.
- [234] Bjellqvist B, Hughes GJ, Pasquali C, et al. The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis* 1993; 14:1023-1031.
- [235] Welsch R, Maass D, Voegel T, Dellapenna D, Beyer P. Transcription factor RAP2.2 and its interacting partner SINAT2: stable elements in the carotenogenesis of *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol* 2007; 145:1073-1085.
- [236] Rogers DP, Brouillette CG, Engler JA, et al. Truncation of the amino terminus of human apolipoprotein A-I substantially alters only the lipid-free conformation. *Biochemistry* 1997; 36:288-300.
- [237] Heinecke JW. The HDL proteome: a marker--and perhaps mediator--of coronary artery disease. *J Lipid Res* 2009; 50 Suppl:S167-171.
- [238] Heinecke JW. The protein cargo of HDL: implications for vascular wall biology and therapeutics. *J Clin Lipidol* 2010; 4:371-375.
- [239] Vaisar T, Pennathur S, Green PS, et al. Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL. *J Clin Invest* 2007; 117:746-756.
- [240] Sorci-Thomas MG, Curtiss L, Parks JS, Thomas MJ, Kearns MW, Landrum M. The hydrophobic face orientation of apolipoprotein A-I amphipathic helix domain 143-164 regulates lecithin:cholesterol acyltransferase activation. *J Biol Chem* 1998; 273:11776-11782.
- [241] Alexander ET, Bhat S, Thomas MJ, et al. Apolipoprotein A-I helix 6 negatively charged residues attenuate lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) reactivity. *Biochemistry* 2005; 44:5409-5419.
- [242] Cigliano L, D'Andrea L, Maresca B, et al. Relevance of the amino acid conversions L144R (Zaragoza) and L159P (Zavalla) in the apolipoprotein A-I binding site for haptoglobin. *Biol Chem* 2008; 389:1421-1426.
- [243] Langlois MR, Delanghe JR. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clin Chem* 1996; 42:1589-1600.

- [244] Nicholls SJ, Dusting GJ, Cutri B, et al. Reconstituted high-density lipoproteins inhibit the acute pro-oxidant and proinflammatory vascular changes induced by a periarterial collar in normocholesterolemic rabbits. *Circulation* 2005; 111:1543-1550.
- [245] Gomaschi M, Calabresi L, Rossoni G, et al. Anti-inflammatory and cardioprotective activities of synthetic high-density lipoprotein containing apolipoprotein A-I mimetic peptides. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 324:776-783.
- [246] Cho K, Park S, Han J, Kim H, Choi Y, Choi I. ApoA-I mutants V156K and R173C promote anti-inflammatory function and antioxidant activities. *Eur J Clin Invest* 2006; 36:875-882.
- [247] Parolini C, Chiesa G, Gong E, et al. Apolipoprotein A-I and the molecular variant apoA-I(Milano): evaluation of the antiatherogenic effects in knock-in mouse model. *Atherosclerosis* 2005; 183:222-229.
- [248] Shah PK, Yano J, Reyes O, et al. High-dose recombinant apolipoprotein A-I-Milano mobilizes tissue cholesterol and rapidly reduces plaque lipid and macrophage content in apolipoprotein E-deficient mice - Potential implications for acute plaque stabilization. *Circulation* 2001; 103:3047-3050.
- [249] Ibanez B, Vilahur G, Cimmino G, et al. Rapid change in plaque size, composition, and molecular footprint after recombinant apolipoprotein A-I Milano (ETC-216) administration: magnetic resonance imaging study in an experimental model of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51:1104-1109.
- [250] Kaul S, Coin B, Hedayiti A, et al. Rapid reversal of endothelial dysfunction in hypercholesterolemic apolipoprotein E-null mice by recombinant apolipoprotein A-I(Milano)-phospholipid complex. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44:1311-1319.

ANEXO

8. ANEXO

El trabajo realizado durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral dio lugar a la siguiente publicación:

Fiddyment S, Pocovi M, Garcia-Otin A. Síntesis y Purificación de Apolipoproteína Apo A-I Zaragoza (L144R) Recombinante. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 2010: 146-153.



ORIGINAL

Síntesis y purificación de apolipoproteína apo A-I Zaragoza (L144R) recombinante

Sarah Fiddymment Puertas^{a,b,*}, Miguel Pocoví Mieras^{a,b,c} y Ángel-Luis García-Otín^a

^aLaboratorio de Investigación Molecular, Hospital Universitario Miguel Servet Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (I+CS), Zaragoza, España

^bDepartamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España

^cCentro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Valencia, España

Recibido el 29 de diciembre de 2009; aceptado el 8 de abril de 2010

Disponible en Internet el 23 de junio de 2010

PALABRAS CLAVE

Apolipoproteína A-I;
Apolipoproteína A-I Zaragoza;
Expresión proteica

Resumen

Introducción: La apolipoproteína A-I Zaragoza (apo A-I Z, mutación L144R) es una variante de la apolipoproteína A-I cuyos portadores tienen muy baja concentración de colesterol-HDL (c-HDL) pero, aunque presenten factores de riesgo aterogénicos adicionales, paradójicamente no muestran signos de aterosclerosis a nivel subclínico. Estudios metabólicos in vivo realizados en los portadores heterocigotos de esta variante de apo A-I revelaron que tiene una tasa de catabolismo que duplica la de la proteína nativa sugiriendo la posibilidad de que tuviera un efecto favorable sobre el proceso global de transporte reverso de colesterol.

Objetivo: Establecer un sistema de expresión y purificación de apo A-I nativa y apo A-I Z recombinantes de alto rendimiento y elevada pureza con el fin de comparar sus propiedades en distintos aspectos relativos al transporte reverso de colesterol, así como otras características antiaterogénicas de la apo A-I.

Metodología: Partiendo del cDNA de apo A-I nativa se amplificó mediante PCR de la secuencia de la apo A-I madura y se diseñaron los oligonucleótidos cebadores que permitieron el clonaje en un plásmido de expresión inducible pET-45 que incorpora una cola de Histidinas en la posición N-terminal del péptido expresado. Mediante mutagénesis dirigida se introdujo la mutación L144R en la secuencia madura de apo A-I para expresarla con el mismo sistema. Bacterias *E. coli* de la cepa BL21(DE3) fueron transformadas con los plásmidos preparados, la expresión de las correspondientes proteínas fue inducida y su purificación realizada en condiciones no desnaturizantes mediante cromatografía de afinidad en columnas de níquel.

Resultados: La expresión y la purificación de las dos proteínas se realizó con éxito y fue comprobada mediante SDS-PAGE y técnicas inmunoquímicas. Se obtuvieron rendimientos

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: sfiddymment.iacs@aragon.es (S. Fiddymment Puertas).

KEYWORDS

Apolipoprotein A-I;
Apolipoprotein A-I
Zaragoza;
Protein expression

medios superiores a 30 mg de proteína purificada por litro de cultivo con un grado de pureza del 94% para la proteína nativa y 93% para la mutante.

Conclusiones: Se ha conseguido un sistema de expresión y purificación para apo A-I nativa y apo A-I Z de alto rendimiento y pureza adecuados que constituye la base para su posterior caracterización estructural y funcional de las propiedades antiaterogénicas de esta variante de la apo A-I.

© 2009 Elsevier España, S.L. y SEA. Todos los derechos reservados.

Synthesis and purification of recombinant apolipoprotein apo A-I Zaragoza (L144R)**Abstract**

Introduction: Apolipoprotein A-I Zaragoza (apo A-I Z, L144R mutation) is an apolipoprotein A-I variant whose carriers have low HDL-cholesterol (HDL-c) concentrations but, paradoxically, no atherosclerotic symptoms despite the presence of additional atherogenic risks. In vivo metabolic studies performed on heterozygous carriers of this apo A-I variant revealed a two-fold increased fractional catabolic rate compared to the wild type protein, suggesting an enhanced effect on the overall reverse cholesterol transport process.

Objectives: To establish an expression and purification system of recombinant wild type apo A-I and apo A-I Z with high yield and purity in order to compare their properties related to reverse cholesterol transport as well as other anti-atherogenic characteristics.

Methods: A cDNA clone of wild type apo A-I was used as a PCR template to amplify the mature peptide sequence. Specially designed primers allowed the cloning of the sequence into an inducible expression pET-45 plasmid adding a Histidine tag in the N-terminal expressed peptide. Site directed mutagenesis was used to produce the L144R mutation in the apo A-I sequence to be expressed in the same system. *E. coli* BL21(DE3) were transformed with the prepared plasmids, peptide expression was induced and purification was performed in non-denaturing conditions by nickel affinity chromatography.

Results: Expression and purification of both proteins was achieved and verified by SDS-PAGE and immunochemical procedures. Actual yields were over 30 mg of purified protein per litre of culture and a 94% purity grade for the wild type protein and 93% for the mutant protein were obtained.

Conclusions: A system for the expression and purification of wild type apo A-I and apo A-I Z with high yield and purity grade has been set up. This will be the basis for future structural and functional characterization of the L144R apo A-I mutant allowing the study of its anti-atherogenic properties.

© 2009 Elsevier España, S.L. and SEA. All rights reserved.

Introducción

La relación inversa existente entre la concentración plasmática de colesterol HDL (c-HDL) y el desarrollo de enfermedad cardiovascular ha quedado demostrada desde perspectivas epidemiológicas y fisiológicas¹⁻⁴. El papel ateroprotector que tienen las partículas HDL se atribuye principalmente al rol que desempeñan en el proceso de transporte reverso de colesterol, que permite la extracción del exceso de colesterol en tejidos periféricos y su vehiculización hacia rutas dirigidas a su catabolismo hepático^{5,6}. La apolipoproteína A-I (apo A-I) es el principal componente proteico de las partículas HDL donde, aparte de su función estructural, actúa como cofactor de la enzima lecitin:colesterol acetiltransferasa (LCAT)^{7,8} y como ligando de los receptores scavenger clase B tipo I o el transportador ABCA1^{9,10}.

La apolipoproteína A-I está formada por 243 amino ácidos (aa) y tiene un peso molecular de 28 kDa. En su estructura secundaria hay ocho repeticiones de hélices alfa de carácter anfipático con 11 y 22 aa de longitud separadas por

segmentos ricos en Prolina^{7,11}. Esta estructura es fundamental para la formación y estabilización de la partícula de HDL.

La mayoría de mutaciones en apo A-I descritas producen una pérdida de función y están asociadas a concentraciones plasmáticas bajas de c-HDL (hipoalfalipoproteinemia) afectando negativamente el transporte reverso de colesterol, lo cual constituye un elevado riesgo para el desarrollo precoz de aterosclerosis¹²⁻¹⁶.

Sin embargo existen casos paradójicos que, pese a estar asociados a concentraciones bajas de c-HDL, dan lugar a una ganancia de función y a un efecto cardioprotector. Uno de los casos mejor estudiados es el de la apo A-I Milano¹⁷. Esta variante (R173C) fue descrita por primera vez en 1980 en una familia del norte de Italia cuyos portadores presentaban un marcado déficit en los niveles plasmáticos de c-HDL pero una ausencia total de enfermedad vascular aterosclerótica. Estudios posteriores revelaron que esta mutación favorecía la unión de lípidos y que el catabolismo de las partículas HDL en estos individuos estaba acelerado, lo que explicaría su menor concentración en plasma pero una mayor eficacia en

su función y la consiguiente disminución del riesgo de aterosclerosis.

Estudios en animales demostraron que la administración de apo A-I Milano recombinante disminuía las lesiones ateroscleróticas y en general producía un beneficioso efecto antiaterogénico^{18,19}. Posteriormente también se llevaron a cabo estudios en humanos con resultados que indican que la apo A-I Milano es capaz de revertir la placa de ateroma^{20,21}. Estos trabajos constituyen la base para la utilización de la variante apo A-I Milano como tratamiento farmacológico en situaciones de enfermedad cardiovascular que está siendo desarrollado por distintas compañías.

En el año 2000 nuestro grupo descubrió otra mutación puntual en el gen de la apo A-I que fue denominada apo A-I Zaragoza. La mutación está situada en el exón 4 del gen y da lugar al cambio de amino ácido Leucina por Arginina en posición 144 (L144R). Los portadores heterocigotos de esta mutación mostraban muy baja concentración de c-HDL, pero, de manera similar a lo que ocurre con la apo A-I Milano, no presentan evidencias de aterosclerosis subclínica. Estudios metabólicos en individuos portadores presentaron una velocidad de secreción ligeramente elevada y una velocidad de catabolismo que duplica la de la apo A-I normal²², este hecho sugiere que el proceso de transporte reverso de colesterol puede verse favorecido por la variante apo A-I Z.

Los mecanismos por los que la apo A-I Z pudiera mejorar el proceso de transporte reverso de colesterol o ejercer otros efectos antiaterogénicos no han sido determinados, pero la profundización en su estudio y esclarecimiento puede aportar información que posibilite la utilización terapéutica de la apo A-I Z de una manera análoga a lo que ha ocurrido con la apo A-I Milano.

En este artículo describimos el desarrollo de un sistema eficaz para la producción tanto de apo A-I nativa como de apo A-I Z recombinantes y su purificación por métodos de afinidad. Éste es el primer paso para obtener una fuente de material de calidad que permita la caracterización de sus potenciales propiedades antiaterogénicas.

Materiales y métodos

Construcción del plásmido de expresión de apo A-I nativa

Se utilizó un cDNA de apolipoproteína A-I humana clonado en un plásmido pUC18 (cedido por la Dra. Delia Recalde, Instituto Pasteur, París) como molde para realizar una amplificación por PCR de alta fidelidad utilizando los oligonucleótidos cebadores 5'-CGGCATTCTGGTTTAAAGAT-GAACC GCCGACAGCCCCGTGG-3' (primer A) y 5'-GAGAGGC-GTCGACCACTTACTGGGTGTTGAGCTTCTTAGTG-3' (primer D). Se utilizó la enzima DNA polimerasa Pwo SuperYield (Roche, Basel [Suiza]) y un programa de termociclación tipo «touchdown» consistente en [95°C 2 min, seguido de 10 ciclos de 94°C 15 seg 67°C 30 seg 72°C 1 min con disminución de 1°C la temperatura de annealing por ciclo, y finalmente 30 ciclos de 94°C 15 seg 62°C 30 seg 72°C 1 min seguido de 6 min a 72°C] en un equipo GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA [Estados Unidos]). Los oligonucleótidos cebadores utilizados fueron diseñados para obtener la amplificación de la secuencia de DNA

codificante para el péptido de apo A-I maduro flanqueada por los sitios de restricción Dral y Sall que permitieron su introducción en un plásmido pET-45 (Novagen, Darmstadt [Alemania]) mediante técnicas básicas de biología molecular (fig. 1A y C). La secuencia introducida en el vector de expresión fue comprobada mediante secuenciación de DNA utilizando la técnica de terminadores dideoxi en un sistema MEGABACE (GE Healthcare, Piscataway, NJ [Estados Unidos]). Este plásmido es un vector de expresión heteróloga de proteínas inducible por análogos de la lactosa en *Escherichia coli* que incorpora una cola de Histidina (6xHis) en posición N-terminal del péptido expresado, posibilitando un procedimiento de purificación mediante cromatografía de afinidad. En el diseño del oligonucleótido cebador directo se sustituyeron los codones para Prolina en posiciones 3, 4 y 7 (CCC) por el codón CCG para el cual existe un marcado sesgo de uso en *E. coli*²³ con el objetivo de incrementar el rendimiento en la expresión del polipéptido.

Construcción del plásmido de expresión de apo A-I Z (mutagénesis)

En paralelo a la construcción del plásmido de expresión para apo A-I nativa se construyó un plásmido de expresión para apo A-I Zaragoza en el mismo vector pET-45. Para ello se utilizó una estrategia de mutagénesis dirigida consistente en la realización de dos amplificaciones de DNA mediante PCR utilizando los oligonucleótidos cebadores primer A y 5'-CGCATCTCCTCGCCGCGGGGGCTCAGCTTC-3' (primer B) para producir el fragmento de mutagenesis 1 (464 pb), y 5'-GAAGCTGAGCCCCGCGGAGGAGATGCGCG -3' (primer C) y primer D para producir el fragmento de mutagenesis 2 (334 pb). Se utilizó la enzima DNA polimerasa Pwo SuperYield (Roche, Basel [Suiza]) en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA [Estados Unidos]) y las condiciones de amplificación fueron las mismas descritas en el apartado anterior. Los oligonucleótidos B y C fueron diseñados de tal manera que se introdujo la mutación L144R y el sitio de restricción SacII sobre la posición donde se localiza la mutación. Cada fragmento de mutagenesis fue subclonado en un plásmido pSCB utilizando el kit Blunt PCR Cloning Kit (Stratagene, La Jolla, CA [Estados Unidos]) para clonaje de productos de PCR de extremos romos y la secuencia de cada plásmido (pSCB-M1, pSCB-M2) comprobada mediante secuenciación de DNA de la forma descrita anteriormente. Posteriormente se extrajo la secuencia Dral-SacII del fragmento de mutagenesis 1 del plásmido pSCB-M1 y se subclonó en el plásmido pSCB-M2 dando lugar a la secuencia codificante del péptido maduro de la apo A-I humana con la mutación L144R. Finalmente esta secuencia se subclonó en el vector de expresión pET-45 (Novagen, Darmstadt [Alemania]) de manera similar a lo descrito anteriormente y el resultado comprobado mediante secuenciación de DNA de la forma descrita anteriormente (fig. 1B y C).

Expresión y purificación de apo A-I nativa y apo A-I Z

Bacterias *Escherichia coli* de la cepa BL21(DE3) fueron transformadas con los plásmidos pET-45 con las secuencias

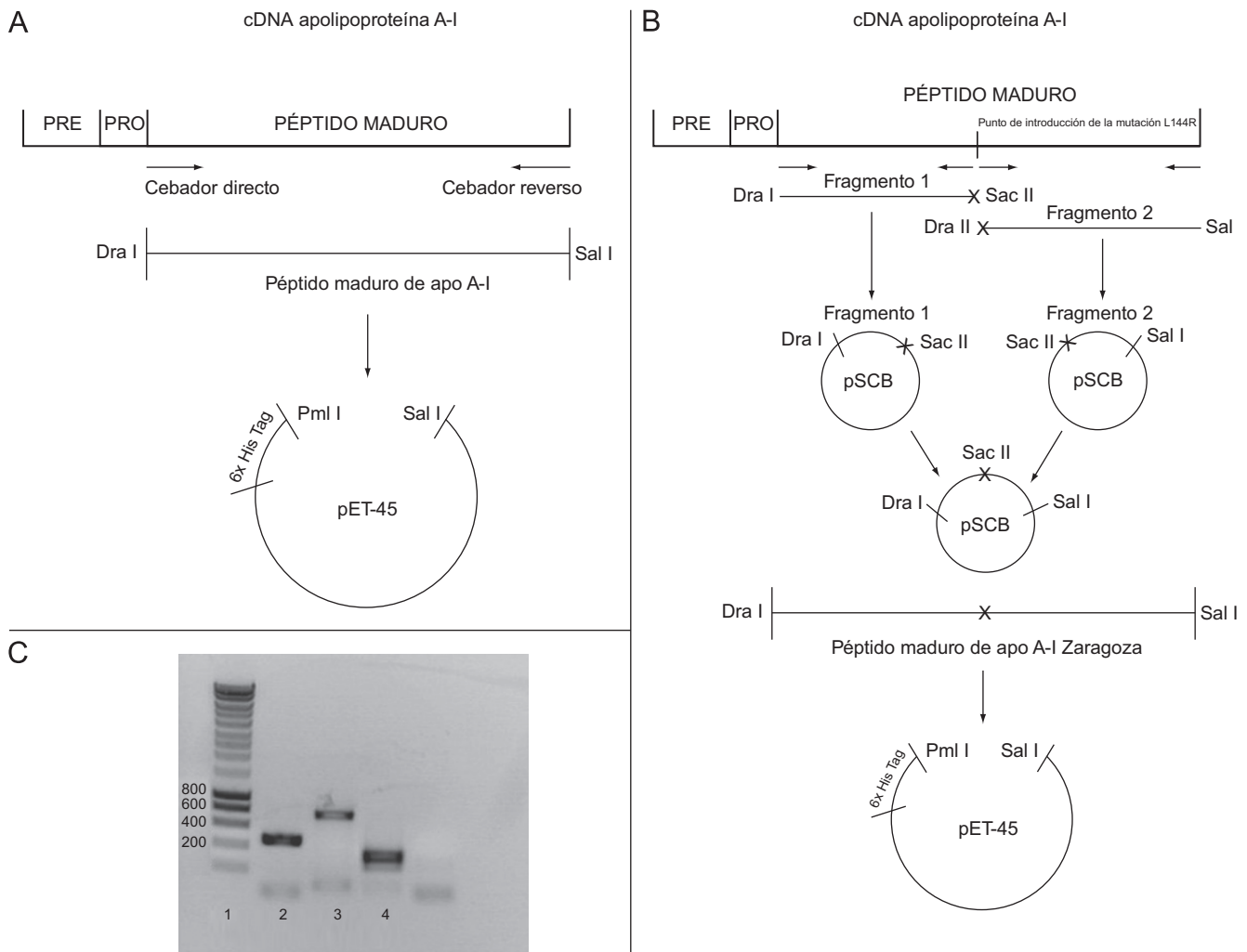


Figura 1 A) Esquema de la construcción del plásmido de expresión de apo A-I nativa. B) Esquema de la construcción del plásmido de expresión de apo A-I Z (mutagénesis). C) Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carriles: 1. Marcador 2. Fragmento de mutagénesis 1 3. Apo A-I nat 4. Fragmento de mutagénesis 2.

de la apo A-I nativa o mutada y sometidas a condiciones de cultivo estándar. Se realizó una curva de crecimiento de las bacterias transformadas para estimar el mejor momento para iniciar la inducción de la expresión de proteína quedando fijada en una densidad óptica a 620 nm de 0,4. Se utilizó isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG) a una concentración final 1 mmol/l y se optimizó el tiempo de inducción para maximizar el rendimiento de producción de proteína. El nivel de expresión de las proteínas de interés en extractos totales de cultivos inducidos durante diferentes periodos de tiempo fue evaluado mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS y tinción con Coomassie como se describe en un apartado posterior y resultó ser óptimo a los 120 min.

La purificación de las proteínas apo A-I nativa y apo A-I Z a partir de cultivos de *E. coli* inducidos se realizó utilizando un protocolo no desnaturizante mediante cromatografía de afinidad en columnas de níquel (fig. 2). Brevemente, los cultivos fueron recogidos y centrifugados a $5400 \times g$ y $4^\circ C$ durante 10 min, y los pellets de bacterias resuspendidos en solución de lisis (LEW buffer $1 \times$ (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, pH 8.0), con 1 mg/ml Lisozima (Sigma, St. Louis, MO

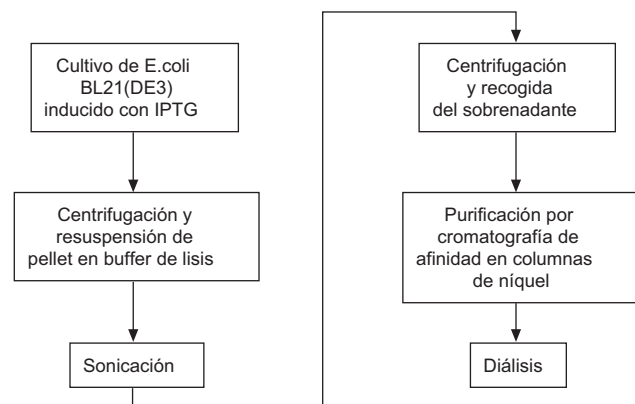


Figura 2 Esquema del proceso de purificación.

[Estados Unidos]) y un cóctel de inhibidores de proteasas Complete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Tablets (Roche, Basel [Suiza]) y sometidos a sonicación en un SONOPULS HD 2200 (Bandelin, Berlin [Alemania]) en 10 tandas de 15 seg con tiempos de descanso intermedios de 30 seg.

Las muestras sonicadas se centrifugaron a $10.000 \times g$ a $4^\circ C$ durante 30 min. Los sobrenadantes fueron aplicados a columnas de afinidad de níquel Protino Ni-TED (Macherey-Nagel, Düren [Alemania]) y, tras su paso por la matriz y dos lavados con tampón LEW 1 \times (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, pH 8.0), las proteínas retenidas en la columna fueron eluidas con el tampón de elución (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 8 M Urea, 250 mM imidazol, pH 8.0). Finalmente la proteína eluida de la columna fue sometida a diálisis exhaustiva frente a tampón fosfato salino (PBS). La concentración de proteína obtenida tras la purificación se realizó mediante medida espectrofotométrica directa a 280 nm utilizando una aproximación de 1 unidad de absorbancia equivalente a 1 mg/ml en el aparato Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, Waltham, [MA Estados Unidos]), exceptuando el caso de las muestras dializadas donde se utilizó un coeficiente de extinción molar para apo A-I de $32350 M^{-1} cm^{-1}$ para calcular la concentración exacta²⁴.

SDS-PAGE y Western blot

Se realizó electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) y tinción con Bio-Safe Coomassie (Bio-Rad, Hercules, CA [Estados Unidos]) para visualizar el nivel de expresión de las proteínas inducido por IPTG y para evaluar el resultado de la purificación por cromatografía de afinidad. Se utilizaron de manera habitual geles con una concentración de acrilamida del 15%. Como marcador de pesos moleculares se usó Protein Marker, Broad Range (2–212 kDa) (New England BioLabs, Ipswich, MA [Estados Unidos]). A partir de las imágenes de los geles se aplicó un protocolo de densitometría que permitió estimar la pureza de las preparaciones de proteína obtenidas.

Para confirmar la identidad de las proteínas cuya expresión era inducida y que eran obtenidas tras purificación se realizó un procedimiento de Western blot. Para ello se transfirieron las proteínas separadas en SDS-PAGE a membrana de nitrocelulosa Trans-Blot Transfer Medium [Bio-Rad, Hercules, CA [Estados Unidos]) y se empleó un protocolo estándar utilizando como anticuerpo primario un anticuerpo policlonal contra apo A-I humana (ab7613, Abcam Cambridge, MA [Estados Unidos]) y como anticuerpo secundario un IgG de cabra (ab6741, Abcam Cambridge, [MA Estados Unidos]) marcado con HRP. La visualización se realizó utilizando los reactivos del kit ECL Western Blotting detection reagents (GE Healthcare, Piscataway, [NJ Estados Unidos]) y el equipo F-ChemiBIS 6.0 Pro DNR (Bio-Imaging Systems, Jerusalem, [Israel]).

Elisa

Se analizó la concentración de apo A-I a lo largo de las diferentes etapas de producción utilizando un kit ELISA comercial (Mabtech [Suecia]) siguiendo las indicaciones del fabricante. El protocolo del análisis utilizado usa como anticuerpo de captura un anticuerpo monoclonal contra apo A-I y como anticuerpo secundario otro anticuerpo monoclonal biotinilado, que es detectado mediante la actividad de una enzima peroxidasa de rabano conjugada con estreptavidina en presencia de un sustrato colorimétrico. El resultado fue adquirido con un equipo de lectura placas

multipocillo Model 680 XR (Biorad, Hercules, CA [Estados Unidos]) a 450 nm y los datos obtenidos analizados con el programa Excel (Microsoft). Estos datos en combinación con las concentraciones de proteína total obtenida en cada paso de la producción y purificación de las proteínas permitieron elaborar una tabla de purificación para el proceso.

Resultados

En el desarrollo del presente trabajo en primer lugar se obtuvieron con éxito vectores de expresión en procariontes para la obtención recombinante tanto de apolipoproteína A-I nativa como de la variante apo A-I Zaragoza. Para ello se utilizaron técnicas básicas de biología molecular que permitieron introducir una secuencia de DNA codificante del péptido maduro de apo A-I en el vector pET-45, así como la producción de la variante correspondiente a apo A-I Zaragoza, con la sustitución del codón CTG a CGC que da lugar al cambio L144R. Adicionalmente se sustituyeron los codones CCC para Pro en posiciones 3, 4 y 7 del péptido maduro por CCG para favorecer la expresión de los péptidos expresados. La comprobación de los vectores producidos mediante secuenciación de DNA permitió verificar que las secuencias introducidas eran correctas.

La inducción de la expresión de proteínas en el sistema elegido está promovida por compuestos estructuralmente análogos a la lactosa, como el IPTG. Tras un tiempo suficiente de inducción se analizaron los lisados bacterianos mediante SDS-PAGE. La aparición de una banda de proteína con un tamaño aproximado de 29 kDa coincidió con el tamaño esperado de las proteínas que se pretendían expresar (tanto apo A-I nativa como apo A-I Zaragoza). La identidad de la proteína cuya expresión era inducida se confirmó mediante Western blot con anticuerpos contra apo A-I humana.

En las pruebas realizadas se determinó que el tiempo óptimo de inducción era de 120 min. El escalado a mayores volúmenes de cultivo para inducir la expresión proteica se realizó sin ser necesarias variaciones respecto a las condiciones de crecimiento y tiempo de inducción previamente utilizadas.

Las proteínas expresadas a partir de los vectores construidos fueron purificadas en un solo paso mediante cromatografía de afinidad en una matriz con níquel y la proteína eluida de la columna fue sometida a diálisis frente a PBS para su uso posterior o almacenamiento. La comprobación del resultado de la purificación se hizo en SDS-PAGE observándose débiles bandas de mayor peso molecular (entre 35–40 kDa) que la proteína expresada en la fracción purificada (fig. 3). Aplicando un protocolo de densitometría se pudo determinar que la pureza de las preparaciones estaba en torno al 94% tanto para la apo A-I nat como para la apo A-I Z.

Mediante Western blot se confirmó que la proteína obtenida en la purificación era apo A-I (fig. 4) y se apreció la presencia de débiles bandas de mayor peso molecular, no coincidentes con las bandas suplementarias observadas en SDS-PAGE teñido con Coomassie, que resultaban mucho más aparentes en la fracción correspondiente al lisado total y al eluato de la columna de afinidad que en la proteína purificada y dializada en PBS. Dados los pesos moleculares

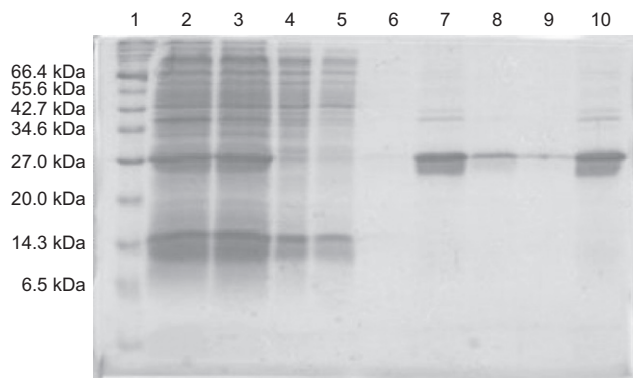


Figura 3 La pureza de la proteína purificada se comprobó en una electroforesis en gel de poliacrilamida (15%) desnaturalizante con SDS. Las muestras se sometieron a una electroforesis a 50 V durante 40 min y después a 100 V 1 h y 30 min. La utilización de un marcador de peso molecular permitió identificar la proteína de interés que tiene un peso molecular aproximado de 29 kDa. Carriles: 1. Marcador 2. Post sonicación 3. Sobrenadante tras centrifugación 4. Sobrenadante no retenido por columna 5. Lavado 1 6. Lavado 2 7. Elución 1 8. Elución 2 9. Elución 3 10. Elución 1+Elución 2 dializado.

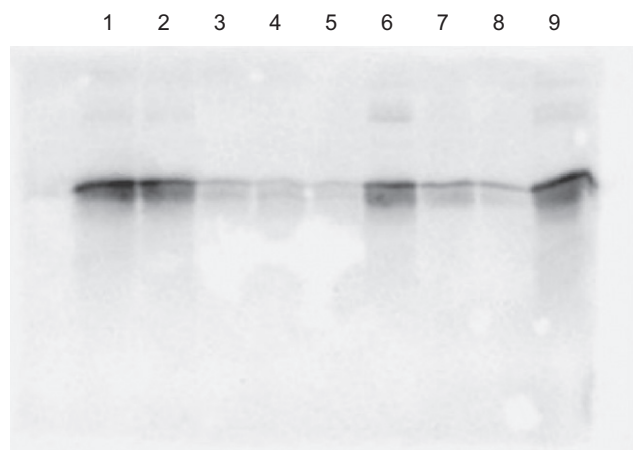


Figura 4 Western blot de la apo A-I Z. Carriles: 1. Post sonicación 2. Sobrenadante tras centrifugación 3. Sobrenadante no retenido por columna 4. Lavado 1 5. Lavado 2 6. Elución 1 7. Elución 2 8. Elución 3 9. Elución 1+Elución 2 dializado.

aproximados de estas débiles bandas reconocidas por los anticuerpos contra apo A-I (55–60 kDa, y 80–90 kDa), cabe la posibilidad de que se trate de dímeros y trímeros de la proteína expresada que no son disgregados en las condiciones de desnaturalización utilizadas.

Con objeto de realizar un seguimiento de las etapas de la purificación se usó un análisis por ELISA que permitió determinar la concentración de apo A-I a lo largo de las etapas de purificación. Se utilizó el porcentaje de la cantidad de apo A-I respecto a la cantidad de proteína total como parámetro para valorar el transcurso de la purificación (tabla 1). Del análisis de los datos obtenidos se puede estimar que tras el tiempo óptimo de inducción alrededor del 4,5% de la proteína total en el cultivo es apo A-I, de toda

esta apo A-I expresada un 85% se recupera en la fracción soluble del lisado bacteriano y tras la purificación mediante cromatografía de afinidad y la posterior diálisis en PBS se obtiene aproximadamente un 55% de la proteína en forma soluble (correspondiente aproximadamente al 45% de la apo A-I producida en el cultivo). El análisis mediante Western blot de la fracción no retenida en la columna y a los lavados de la columna mostró la presencia de apo A-I, lo cual explicaría la pérdida observada. El rendimiento final típico obtenido es de alrededor de 30 mg de apo A-I por litro de cultivo con una pureza superior al 90% como se ha indicado anteriormente. No se observaron diferencias en los parámetros de purificación ni el rendimiento final entre la apo A-I nativa y la apo A-I Zaragoza.

Discusión

En este trabajo hemos diseñado y desarrollado un sistema novedoso de producción de la apo A-I nativa recombinante además de generar por primera vez la apo A-I Z completa recombinante.

El primer punto a tratar en el diseño fue la elección del sistema de expresión adecuada. La bibliografía presentaba varios posibles sistemas de expresión entre los que destacan sistemas procariotas, principalmente *E. coli*^{25,26}, levaduras (*Pichia pastoris*)²⁷ y en algunos casos células eucariotas, en concreto células de ovario de ratón chino (CHO)²⁸. Cada uno de estos sistemas presentan ventajas y desventajas. Los sistemas de células eucariotas producirán la proteína más parecida a la humana, pudiéndose realizar procesos de maduración dentro de la célula, pero presenta el inconveniente de la dificultad de manipulación y un rendimiento no muy elevado.

La producción en levaduras al igual que el sistema de eucariotas da lugar a una proteína procesada de forma parecida a la humana, pero la necesidad de fermentadores de gran escala para obtener buenos rendimientos hace que no sea el sistema más apropiado para nuestro estudio.

El sistema de expresión más utilizado es el de *E. coli*, debido a su eficacia y facilidad de manipulación. Dado que la apo A-I no necesita modificaciones post-traduccionales, hace posible su expresión en células procariotas aunque se debe tener en cuenta que al no producirse la proteólisis de la pre-proteína, es necesario trabajar exclusivamente con la secuencia madura de la apo A-I. Un hecho importante a tener en cuenta es que la eliminación de estos amino ácidos del segmento pre y pro hace que la expresión de la proteína baje notablemente. Para rectificar esto alteramos ciertos codones por otros degenerados de uso más frecuente en *E. coli*, ayudando así a recuperar los niveles de expresión²⁶.

La incorporación de una cola de histidina a la proteína recombinante facilita mucho su purificación permitiendo el uso de cromatografía de afinidad en columnas de níquel para separar la proteína del extracto crudo. Pero también presenta el inconveniente de que la proteína recombinante lleva en un extremo 6 histidinas adicionales que no forma parte de su estructura original y que potencialmente pudieran afectar a su estructura y función. Para rectificar esto es necesario tener un proceso de eliminación de la cola de histidina, siendo el procedimiento más empleado el de hidrólisis enzimática. Sin embargo, uno de los problemas

Tabla 1 Tabla de purificación de apo A-I nat y apo A-I Z a partir de cultivos de 100 ml inducidos con IPTG

	Tras lisis y sonicación	Sobrenadante tras centrifugación	Sobrenadante no retenido por columna	Lavado 1	Dialisis
APO A-I NATIVA					
[Proteína total] mg/ml	28,85	25,00	19,04	6,49	0,54
[Apo A-I] mg/ml	1,38	1,17	0,04	0,02	0,51
[Apo A-I]/[Proteína total] (%)	4,78	4,67	0,19	0,30	94,35
APO A-I Z					
[Proteína total] mg/ml	27,43	21,90	16,19	6,08	0,65
[Apo A-I] mg/ml	1,23	1,05	0,02	0,01	0,61
[Apo A-I]/[Proteína total] (%)	4,49	4,80	0,15	0,23	93,92

más comunes en la manipulación de apo A-I es que a lo largo de su secuencia es susceptible a la digestión enzimática por numerosas enzimas (factor X, enterokinasa... etc).

Distintos estudios encontraron estrategias variadas para solucionar este problema; creando un sitio de corte para la proteasa de la Ig A (de *Neisseria gonorrhoeae*) o «lgase»²⁵ que no corta en apo A-I, creando un enlace adicional en el extremo amino terminal que fuera ácido-lábil²⁶ o lipidando la proteína antes de usar la enzima^{7,12,29}. De esta forma la enzima no puede atacar a la proteína ya que los lípidos unidos a él protegen los posibles sitios de corte. No obstante, estudios previos han demostrado que los 43 aminoácidos del extremo N-terminal no están involucrados en la asociación a lípidos³⁰. Dado que la cola de histidinas de nuestras proteínas recombinantes están en dicho extremo, pensamos que no se vería afectada la función de la proteína. Pero en caso de querer eliminar la cola de histidinas, se puede utilizar la enzima exoproteolítica Tagzyme de Qiagen, enzima capaz de eliminar las histidinas desde el extremo amino terminal de una proteína.

En términos de purificación y rendimiento nuestro sistema ha obtenido un rendimiento de al menos 30 mg/l de cultivo en fracción soluble de ambas proteínas recombinantes. Esta cifra sería aun mayor si se tuviera en cuenta la cantidad de proteína retenida en la fracción insoluble. Posiblemente se podría intentar recuperar la proteína de esta fracción aunque presenta mayores problemas de manipulación que la fracción soluble además de correr el riesgo de que la proteína se haya agregado o degradado.

La pureza de ambas proteínas es elevada, entorno a 94–93% respectivamente.

Comparando estas cifras con las de otros estudios podemos observar que el rendimiento es bueno, sobre todo teniendo en cuenta la facilidad de manipulación. Sin duda el sistema con el mejor rendimiento es el de la levadura *Pichia pastoris*, pero requiere una instrumentación especializada (p.ej. fermentadores) a las que no tenemos acceso, además de emplear un protocolo más largo y laborioso.

El rendimiento de algunos sistemas de *E.coli* también es superior a la nuestra pero como consecuencia de la manipulación genética de numerosos codones, favoreciendo su producción. La manipulación genética adicional requerida para hacer esto hace que el proceso no sea tan rápido ni eficaz como nuestro protocolo.

En resumen, hemos optimizado la producción y mutagénesis de la apo A-I nativa y apo A-I Zaragoza, para su posterior caracterización estructural y funcional. Para ello hemos introducido varias mutaciones silenciosas en la secuencia codificante de la apo A-I para aumentar la proporción de codones más representativos en *E.coli*. De esta forma favorecemos la mayor producción de proteína. También hemos elegido un sistema de purificación sencillo utilizando una cola de histidinas y cromatografía de afinidad en columnas de níquel. Con el rendimiento y pureza obtenida con ambas proteínas podemos proceder a realizar ensayos tanto de funcionalidad como de estructura para profundizar más en el efecto que tiene la mutación L144R en la apolipoproteína A-I. Por otra parte, el procedimiento y tecnología utilizado en este estudio puede servir de modelo para la producción y purificación de otras proteínas de interés biológico.

Financiación

Este estudio ha sido desarrollado en parte con fondos: FIS 06/1238, FIS 09/00665, FIS 06/1402.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Este trabajo recibió una Mención Especial en el XXI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Arteriosclerosis celebrado en Madrid en 2008.

Agradecemos a la Dr. Delia Recalde el plásmido con el cDNA de la apo A-I humana.

Bibliografía

1. Miller GJ, Miller NE. Plasma-high-density-lipoprotein concentration and development of ischaemic heart-disease. *Lancet*. 1975;1:16–9.
2. Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR. High density lipoprotein as a protective factor against coronary

- heart disease. The Framingham Study. *Am J Med.* 1977;62:707–14.
3. Eisenberg S. High density lipoprotein metabolism. *J Lipid Res.* 1984;25:1017–58.
 4. Lewis GF, Rader DJ. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ Res.* 2005;96:1221–32.
 5. Schaefer EJ, Lamon-Fava S, Ordovas JM, Cohn SD, Schaefer MM, Castelli WP, et al. Factors associated with low and elevated plasma high density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein A-I levels in the Framingham Offspring Study. *J Lipid Res.* 1994;35:871–82.
 6. Fielding CJ, Fielding PE. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res.* 1995;36:211–28.
 7. Cho KH, Jonas A. A key point mutation (V156E) affects the structure and functions of human apolipoprotein A-I. *J Biol Chem.* 2000;275:26821–7.
 8. Schmitz G, Kaminski WE. ABC transporters and cholesterol metabolism. *Front Biosci.* 2001;6:505–14.
 9. Oram JF, Vaughan AM. ABCA1-mediated transport of cellular cholesterol and phospholipids to HDL apolipoproteins. *Curr Opin Lipidol.* 2000;11:253–60.
 10. Rader DJ. Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies. *J Clin Invest.* 2006;116:3090–100.
 11. Vedhachalam C, Liu L, Nickel M, Dhanasekaran P, Anantharamaiah GM, Lund-Katz S, et al. Influence of ApoA-I structure on the ABCA1-mediated efflux of cellular lipids. *J Biol Chem.* 2004;279:49931–9.
 12. Miller M, Aiello D, Pritchard H, Friel G, Zeller K. Apolipoprotein A-I(Zavalla) (Leu159→Pro): HDL cholesterol deficiency in a kindred associated with premature coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:1242–7.
 13. Hovingh GK, Brownlie A, Bisoendial RJ, Dube MP, Levels JH, Petersen W, et al. A novel apoA-I mutation (L178P) leads to endothelial dysfunction, increased arterial wall thickness and premature coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44:1429–35.
 14. Sorci-Thomas MG, Thomas MJ. The effects of altered apolipoprotein A-I structure on plasma HDL concentration. *Trends Cardiovasc Med.* 2002;12:121–8.
 15. Miettinen HE, Jauhiainen M, Gylling H, Ehnholm S, Palomaki A, Miettinen TA, et al. Apolipoprotein A-IFIN (Leu159→Arg) mutation affects lecithin cholesterol acyltransferase activation and subclass distribution of HDL but not cholesterol efflux from fibroblasts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:3021–32.
 16. Huang W, Sasaki J, Matsunaga A, Nanimatsu H, Moriyama K, Han H, et al. A novel homozygous missense mutation in the apo A-I gene with apo A-I deficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:389–96.
 17. Franceschini G, Sirtori CR, Capurso A, Weisgraber KH, Mahley RW. A-I Milano apoprotein. Decreased high density lipoprotein cholesterol levels with significant lipoprotein modifications and without clinical atherosclerosis in an Italian family. *J Clin Invest.* 1980;66:892–900.
 18. Ameli S, Hultgardh-Nilsson A, Cercek B, Shah PK, Forrester JS, Ageland H, et al. Recombinant apolipoprotein A-I Milano reduces intimal thickening after balloon injury in hypercholesterolemic rabbits. *Circulation.* 1994;90:1935–41.
 19. Shah PK, Nilsson J, Kaul S, Fishbein MC, Ageland H, Hamsten A, et al. Effects of recombinant apolipoprotein A-I(Milano) on aortic atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation.* 1998;97:780–5.
 20. Nicholls SJ, Tuzcu EM, Sipahi I, Schoenhagen P, Crowe T, Kapadia S, et al. Relationship between atheroma regression and change in lumen size after infusion of apolipoprotein A-I Milano. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47:992–7.
 21. Nissen SE, Tsunoda T, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Cooper CJ, Yasin M, et al. Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2003;290:2292–300.
 22. Recalde D, Velez-Carrasco W, Civeira F, Cénarro A, Gomez-Coronado D, Ordovas JM, et al. Enhanced fractional catabolic rate of apo A-I and apo A-II in heterozygous subjects for apo A-I(Zaragoza) (L144R). *Atherosclerosis.* 2001;154:613–23.
 23. Sharp PM, Cowe E, Higgins DG, Shields DC, Wolfe KH, Wright F, et al. Codon usage patterns in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens*; a review of the considerable within-species diversity. *Nucleic Acids Res.* 1988;16:8207–11.
 24. Gwynne J, Brewer Jr B, Edelhoch H. The molecular properties of ApoA-I from human high density lipoprotein. *J Biol Chem.* 1974;249:2411–6.
 25. Panagotopoulos SE, Witting SR, Horace EM, Maiorano JN, Davidson WS. Bacterial expression and characterization of mature apolipoprotein A-I. *Protein Expr Purif.* 2002;25:353–61.
 26. Ryan RO, Forte TM, Oda MN. Optimized bacterial expression of human apolipoprotein A-I. *Protein Expr Purif.* 2003;27:98–103.
 27. Feng MQ, Cai QS, Song DX, Dong JB, Zhou P. High yield and secretion of recombinant human apolipoprotein AI in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.* 2006;46:337–42.
 28. Mallory JB, Kushner PJ, Protter AA, Cofer CL, Appleby VL, Lau K, et al. Expression and characterization of human apolipoprotein A-I in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 1987;262:4241–7.
 29. Han JM, Jeong TS, Lee WS, Choi I, Cho KH. Structural and functional properties of V156K and A158E mutants of apolipoprotein A-I in the lipid-free and lipid-bound states. *J Lipid Res.* 2005;46:589–96.
 30. Palgunachari MN, Mishra VK, Lund-Katz S, Phillips MC, Adeyeye SO, Alluri S, et al. Only the two end helices of eight tandem amphipathic helical domains of human apoA-I have significant lipid affinity. Implications for HDL assembly. *Arterioscler. Atheroscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16:328–38.