

Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante **Dr. Rodolfo Amthauer M.** Instituto de Bioquímica Facultad de Ciencias

ESTUDIO COMPARATIVO DE APOLIPOPROTEÍNA A-I DE CARPA Y HUMANA A NIVEL ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL

Tesis de Grado presentada como parte de los requisitos para optar al grado de *Licenciado en Bioquímica* y Título Profesional de *Bioquímico*

RODRIGO ALEJANDRO LÓPEZ LEAL

VALDIVIA – CHILE

2006

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco al Dr. Amthauer por recibirme en su laboratorio, inculcarme el criterio científico y permitirme independencia en mi trabajo sin dejar de ser un guía. A la Dra. Margarita Concha por sus consejos y la permanente entrega de conocimientos. También agradezco a la profesora Julieta por transmitirme su experiencia en el trabajo de laboratorio. A todas las personas con quienes compartí gratos momentos e interesantes discusiones en los laboratorios vecinos del Instituto.

Especialmente agradezco a mis queridos padres, Elena, José y Sergio por ser un pilar fundamental en mi desarrollo como persona y apoyarme siempre en las decisiones importantes.

Agradezco además a quienes fueron parte del desarrollo de este trabajo, profesores y compañeros de laboratorio con quienes compartí mis primeros momentos como investigador. Agradezco muy especialmente a mis grandes amigos Iván, Denise, Gaspar, Yogui, Jaimito, Cesar, Chani. También a la Isi, Jani y Tano. A mis amigos de antaño y de hoy David, Kco y Landy con los cuales he compartido momentos inolvidables.

A Jessica por su cariño, paciencia y comprensión. A mis hermanos, Marcela Gonzalo, Melisa, titi y Gabriela, a la Chofi y a toda mi familia.

Este trabajo fue posible gracias al financiamiento de los proyectos DID-UACH S-2002-11 y S-2003-53.

INDICE DE CONTENIDOS

			I	Página
1. RESUME	N			1
1. SUMMAR	RY			2
2. INTRODU	JCCIÓN			3
3. MATERIA	ALES Y	ÉTODOS		14
3.1	MATE	IALES		14
	3.2	IETODO		16
	3.2.1	Rastreo de clones conteniendo	la secuencia completa	16
		de apoA-I de carpa		
	3.2.1.1	Cálculo del título de la biblioteo	a de cDNA de hígado de	16
		carpa		
	3.2.1.2	Síntesis de sondas radioactiva	S	16
	3.2.1.2	Purificación de RNA total	por el método de Trizol	17
	3.2.1.2	Purificación de mRNA a p	oartir de RNA total de	18
	hígado de carpa.			
	3.2.1.2	Síntesis sonda radiactiva	una hebra	19
	3.2.1.2	Síntesis de sonda radiact	iva doble hebra	19
	3.2.1.3	Cuantificación de las sondas m	iediante cuentas de TCA	20
		precipitables		
	3.2.1.4	Rastreo del cDNA de largo con	npleto para apoA-I de	20
		carpa		

ii

3.2.1.4.	1 Obtención de unidades formadoras de lisis (ufp).	20
3.2.1.4.	2 Transferencia de las ufp a membranas de	21
	nitrocelulosa.	
3.2.1.4.	3 Prehibridación e hibridación de las membranas.	22
3.2.1.4.	4 Lavados y exposición de los filtros.	22
3.2.1.4.	5 Recolección de los clones positivos.	23
3.2.1.5	Rastreo secundario.	
3.2.1.6	Amplificación de las ufp seleccionadas y obtención del	24
	plásmido recombinante para apoA-I de carpa.	
3.2.1.7	Obtención de DNA plásmidial por método de ebullición.	25
3.2.1.8	Digestión del DNA mediante enzimas de restricción.	25
3.2.1.9	Amplificación de DNA mediante reacción en cadena de	26
	la polimerasa (PCR).	
3.2.1.10	Electroforesis en gel de agarosa.	27
3.2.1.11	Southern blot.	28
3.2.2	Purificación de proteínas.	28
3.2.2.1	Obtención de plasma de carpa.	28
3.2.2.2	Obtención de plasma humano.	29
3.2.2.3	Purificación de HDL de carpa mediante cromatografía	29
	de afinidad.	
3.2.2.4	Purificación de HDL humana mediante cromatografía de	30
	afinidad.	
3.2.2.5	Purificación de apoA-I mediante cromatografía de	30

filtración en gel.

3.2.2.6	Determinación de concentración de proteínas por el	31	
	método de Sedmak.		
3.2.3	Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) y	32	
	Western blot.		
3.2.3.1	PAGE-SDS.		
3.2.3.2	Western blot.	33	
3.2.3.2.	1 Electrotransferencia.	33	
3.2.3.2.	2 Inmunodetección.	34	
3.2.4	Preparación de apoA-I truncada en el extremo carboxilo	35	
	terminal.		
3.2.5	Ensayo de solubilización de vesículas multilaminares de	35	
	DMPC con apoA-I intacta y truncada.		
3.2.6	Análisis bioinformático de apoA-I.	36	
3.2.7	Ensayo de unión de apoA-I y HDL a espermatozoides	37	
	de bovino.		
3.2.8	Inmunocitoquímica en espermatozoides incubados con	38	
	apoA-I o HDL		
3.2.9	Cultivo de células BHK-21.	39	
3.2.10	Ensayo de unión de HDL y apoA-I a células BHK-21.	39	
3.2.11	Inmunocitoquímica en células BHK-21. 39		
3.2.12	Obtención de extracto crudo de membrana plasmática 40		
	de células BHK-21.		

4. RESULTADOS.		41
4.1	Rastreo del clon conteniendo el cDNA completo para	41
	apoA-I de carpa.	
4.1.	1 Síntesis de sonda radioactiva para el rastreo.	41
4.1	2 Rastreo de la biblioteca de cDNA de hígado de carpa.	41
4.2	Análisis de secuencia	48
4.3	Predicción de la estructura terciaria de apoA-I de carpa.	63
4.4	Análisis funcional de apoA-I.	66
4.4.	1 Purificación de HDL y apoA-I de carpa y humana.	66
4.4.	2 Ensayo de solubilización de vesículas multilaminares de	68
	dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC).	
4.4.	3 Análisis comparativo de la solubilización por apoA-I de	68
	carpa intacta o truncada en el extremo carboxilo a	
	vesículas multilaminares de DMPC.	
4.4.	4 Análisis de la interacción de apoA-I y HDL de carpa con	71
	membranas de eucariontes.	
4.4.	4.1 Unión de apoA-I de carpa a membranas de células	73
	BHK-21	
4.4.	4.2 Estudio de interacción de apoA-I y HDL de carpa con	73
	espermatozoides eyaculados de bovino.	
5. DISCUSION.		77
6. REFERENCIAS		97

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1	Participación de apoA-I en el transporte reverso de colesterol	5
Figura 2	Representación en cinta del tetrámero apoA-I Δ (1-43) de humano	11
Figura 3	Síntesis de sonda radioactiva una hebra.	42
Figura 4	Análisis de restricción para los putativos clones de apoA-I de	45
	carpa obtenidos del rastreo	
Figura 5	Identificación y caracterización del clon con la secuencia	46
	completa de apoA-I de carpa	
Figura 6	Identificación y caracterización del clon de apoA-I de carpa	47
	mediante PCR utilizando partidores específicos	
Figura 7	Identificación y caracterización del clon de apoA-I de carpa por	49
	Southern blot	
Figura 8	Secuencia nucleotídica y aminoacídica del clon de apoA-I de	50
	carpa	
Figura 9	Dendrograma de diversas secuencias de apoA-I.	52
Figura 10	Análisis comparativo entre las pre-pro-apoA-I de carpa y otros	53
	teleósteos.	
Figura 11	Alineamiento de secuencia entre apoA-I de carpa y humana	57
Figura 12	Análisis de predicción de estructura secundaria para apoA-I de	59
	Carpa y Humana.	
Figura 13	Alineamiento de las repeticiones de 11 aminoácidos en apoA-I de	60
	Carpa.	

Figura 14	Alineamiento de las repeticiones de 11 aminoácidos en apoA-I	62
	humana.	
Figura 15	Representación en "Helical Wheel" de la secuencia consenso de	64
	11 aminoácidos de apoA-I de carpa.	
Figura 16	Modelamiento mediante homología para apoA-I de carpa.	65
Figura 17	Purificación de apoA-I de carpa y humana.	67
Figura 18	Ensayo de solubilización de vesículas multilaminares de	69
	dimiristoilfosfatidilcolina.	
Figura 19.	Análisis comparativo de la solubilización por apoA-I de carpa	70
	intacta y truncada en el extremo carboxilo a vesículas	
	multilaminares de DMPC.	
Figura 20	Análisis de la interacción de apoA-I y HDL de carpa con	72
	membranas de eucariontes.	
Figura 21	Unión de apoA-I de carpa a membranas de células BHK-21.	74
Figura 22	Estudio de la interacción de apoA-I y HDL de carpa con	76
	espermatozoides eyaculados de bovino.	
Tabla 1.	Propiedades físico químicas de la secuencia nucleotídica,	55
	aminoacídica deducida de la pre-pro-apoA-I y de la apoA-I	
	madura de carpa.	
Tabla 2	Composición aminoacídica de apoA-I de carpa madura.	56

LISTAS DE ABREVIATURAS

aa ABCA-I	: residuos aminoacídicos.
ANS	: acido 8-anilino-1-naffaleno sulfonico.
ApoA-I	: apolipoproteína A-I.
BCIP	: 5-Bromo 4-Cloro-3-indolil fosfato.
BSA	: albúmina de suero bovino.
DMPC	: dimiristoilfosfatidilcolina.
dNTP	: desoxirribonucleotido trifosfato.
DO	: densidad óptica.
EDTA	: ácido etilendiaminotetracético.
HDL	: lipoproteína de alta densidad.
LCAT	: lecithin-cholestrol aciltransferase.
LDL	: lipoproteína de baja densidad.
NBT	: azul de nitro tetrazolio.
PCR	: reacción en cadena de la polimerasa.
PMSF	: fluoruro de fenilmetil sulfonilo.
SDS	: dodecilsulfato de sodio.
SR-BI	: scavenger receptor B1.
TEMED	: NNN', N'-tetrametilenetilendiamina.
Tris	: tris (hidroximetil)-aminometano.
ufp	: unidad formadora de placa.
VLDL	: lipoproteína de muy baja densidad

1. RESUMEN.

La lipoproteína de alta densidad (HDL) y su principal constituyente proteico, apolipoproteína A-I (apoA-I), juegan un rol central en el transporte reverso de colesterol. Estudios previos han demostrado que el extremo carboxilo terminal de apoA-I es crucial en la asociación a lípidos de membrana, evento clave en la movilización del colesterol. Las apoA-I de distintas especies presentan baja similitud en su estructura primaria, particularmente en su dominio carboxilo terminal. En el presente trabajo se obtuvo la secuencia completa del cDNA para apoA-I de carpa y con ella, se realizó un estudio comparativo de la estructura y función de apoA-I, entre 2 especies que presentan alta divergencia en su estructura primaria, como lo son apoA-I de humano y carpa. Se estableció que a pesar de ello, ambas presentan las características regiones de α hélices anfipáticas flanqueadas por residuos de prolinas. Estudios de predicción de estructura secundaria indican que apoA-I de carpa tendría un contenido significativamente mayor de estructura α -helicoidal que su ortólogo en humano.

La interacción de apoA-I con lípidos se evaluó mediante un método turbidimétrico que utiliza vesículas multilaminares de dimiristoilfosfatidil colina (DMPC). La apoA-I de carpa resultó ser un 50 % más eficiente en su interacción con las vesículas que la proteína humana. Sin embargo, esta interacción disminuyó drásticamente cuando se utilizó apoA-I truncada en el extremo carboxilo terminal. Estos resultados sugieren que el extremo C-terminal de apoA-I de carpa sería más eficiente en la interacción con membranas que el dominio correspondiente de apoA-I humana. Además nuestros estudios demuestran que tanto apoA-I libre de lípidos como asociada a HDL, es capaz de unirse a membranas eucarióticas heterólogas.

SUMMARY.

High density lipoprotein (HDL) and its main protein, apolipoprotein A-I (apoA-I), plays a central rol in the reverse transport of cholesterol. Previous studies have demonstrated that the carboxy termini domain of apoA-I is crucial for its association to membrane lipids, a key event in the mobilization of cholesterol. ApoA-I of different species displays low similarity in its primary structure, particularly in their C-termini. The aim of the present work was to obtain the complete cDNA sequence for carp apoA-I and to compare the structure and function of apoA-I, between two species that show a high divergence in their primary structure, namely human and carp apoA-I. We established that in spite of their difference, both present the characteristic amphipatics helices flanked by residues of prolines. Secondary structure prediction studies indicate that carp apoA-I would have a significantly greater content of α -helix structure than its human ortolog.

The interaction of apoA-I with lipids was evaluated by means of a turbidimetric assay that uses multilamellar vesicles of dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC). Carp apoA-I resulted to be a 50 % more efficient in its interaction with the vesicles than the human protein. Nevertheless, this interaction diminished drastically when apoA-I truncated in the C-termini was used. These results suggest that the C-terminal end of carp apoA-I would be more efficient in the interaction with membranes than the corresponding domain of human apoA-I. In addition our studies demonstrate that both, lipids free apoA-I and HDL, are able to associate to heterologous eukaryotic membranes.

2. INTRODUCCIÓN.

Las lipoproteínas de alta densidad se pueden definir como partículas globulares complejas constituidas de proteínas y lípidos que viajan a través de la circulación. Su estructura básica está constituida por una superficie externa hidrofílica y un interior hidrofóbico. La superficie externa está compuesta por proteínas (apolipoproteínas) y grupos fosfato de los fosfolípidos que están en contacto con la fase acuosa, mientras su interior hidrofóbico aloja colesterol y cadenas hidrocarbonadas de fosfolípidos y triglicéridos.

Las distintas apolipoproteínas, tales como apoA-I, A-II, C-I, C-II, C-III y E3 se combinan con lípidos para formar diferentes clases de partículas lipoproteícas, diferenciándose por su densidad, tamaño y composición lipídica y de apolipoproteínas. Debido a esto, es posible encontrar en el torrente circulatorio quilomicrones (con la menor densidad de las lipoproteínas), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), de baja densidad (LDL), y de alta densidad (HDL), las cuales se caracterizan por poseer la capacidad de solubilizar los lípidos en el plasma. Las apolipoproteinas constituyentes de estas partículas son intercambiables, puesto que son capaces de distribuirse entre distintas partículas lipoproteícas.

Las apolipoproteínas se encuentran presentes en una gran variedad de organismos, desde insectos, peces y mamíferos, siendo las apolipoproteínas de humano las más estudiadas (Bolaños-Garcia y Nuñez, 2003).

El rol de las apolipoproteínas dentro de las partículas lipoproteícas ha sido bien documentado durante los últimos 20 años, sin embargo los mecanismos moleculares

que gobiernan sus actividades permanecen bajo intensas investigaciones. Actualmente la determinación de las estructuras tridimensionales para varias apolipoproteínas ha proporcionado nuevos antecedentes para establecer un marco en el entendimiento de los mecanismos involucrados en sus actividades. Por otro lado, existe evidencia de la participación de apolipoproteína A-I (apoA-I) y otras apolipoproteínas en diversos procesos celulares en humanos, destacándose actividades anticoagulantes, antiviral, antimicrobiana, inhibidor de lisis de membrana por el complemento, inhibidor de endotoxinas bacterianas, estabilizador de prostaciclinas, inhibidor de la oxidación de LDL entre otras, no limitándose tan solo a la unión y transporte de lípidos (Brouillette y col, 2001; Srinivas y col., 1991; Tada y col., 1993; Burger y col., 2002).

HDL y su principal componente proteico, apoA-I, tiene como función más conocida la de solubilizar y transportar lípidos y colesterol desde los tejidos periféricos al hígado, para su posterior metabolización y excreción, vía denominada transporte reverso de colesterol (TRC). Son conocidos los estudios epidemiológicos que han demostrado que altos niveles de HDL en circulación están relacionados con bajos riesgos de contraer enfermedades cardiovasculares en humanos. Este hecho ha atraído la atención de múltiples grupos de investigación que han puesto sus esfuerzos en tratar de comprender los mecanismos moleculares por los cuales se desenvuelven las actividades de esta lipoproteína y su principal componente proteico.

El rol que cumple HDL y apoA-I en el TRC es complejo. En la Figura 1, se muestra en forma esquemática el rol de HDL en el metabolismo del colesterol, además



Figura 1. Participación de HDL y apoA-I en el transporte reverso de colesterol (Rader y col, 2003). ApoA-I pobre en lípidos adquiere colesterol libre desde las células periféricas (macrófago) a través de un proceso de eflujo, el cual es facilitado por el transportador ABCA-I (Lin, 2002). El colesterol libre (FC) es convertido en colesterol-ester (CE) por la transferencia de un ácido graso desde una molécula de fosfatidilcolina, por la enzima LCAT. En este punto los CE de HDL pueden ser selectivamente transferidos al hígado, proceso mediado por SR-BI, para posteriormente ser metabolizado a FC y excretado en la bilis. Además, en este punto los esteres de colesterol de HDL también pueden ser transferidos a lipoproteínas conteniendo apoB (VLDL, LDL) por la acción CETP (CE transfer protein), produciendo apoA-I libre o pobre en lípidos las que estarían en condiciones de reanudar un nuevo ciclo.

de la interacción de ésta partícula con diversas estructuras y elementos que finalmente logran mantener, en condiciones normales, la homeostasis de colesterol en el organismo.

Por otro lado, en humanos el gen de apoA-I tiene un tamaño de 2,4 kpb conteniendo 2 intrones de 185 y 588 pares de bases (Shoulders y col 1983), se encuentra formando parte de un "cluster" compuesto por el gen de apoC-III y apoA-IV y se localiza en el brazo largo del cromosoma 11 (11q23-q24). Los análisis de secuencia realizados en el gen de apoA-I humana mostraron 6 regiones altamente homólogas de 66 pb, sugiriendo que el gen podría haber estado involucrado en eventos de duplicación intragénicas en tandem (Karathanasis y col 1983). Paul-Hayase y col. (1992), mostró evidencias de que las variantes genéticas de este "cluster" están asociadas con distintos niveles plasmáticos de HDL.

Estudios de expresión de apoA-I demuestran que en vertebrados ésta se expresa principalmente en el hígado y el intestino delgado. Sin embargo, se ha descrito la síntesis de esta proteína en varios tejidos periféricos, como en células endoteliales de cerebro de cerdo, (Weiter-Güttler y col., 1990) y en piel, células granulosas, riñón, músculo y cerebro del pollo (Tarugi y col., 1991; Hermann y col., 1998; Byrnes y col., 1987). Gordon y col, (1983), realizaron estudios de síntesis de apoA-I en intestino de humanos y ratones demostrando que el producto de traducción primario para apoA-I mostraba ser una pre-pro proteína, donde el pre-péptido (péptido de señal) es escindido co-traduccionalmente y la pro-proteína es secretada como tal al plasma, donde posteriormente el pro-péptido sería escindido proteolíticamente por una enzima en el plasma, para dar como producto final la proteína madura.

En nuestro laboratorio se ha evaluado la expresión de apoA-I en la carpa común, encontrando expresión en hígado y no en intestino como en otros organismos, sin embargo la inmunodetección de apoA-I en intestino resulta positiva, sugiriendo una posible ruta de circulación hepato-entérica (Inostroza y col, 1990; Amthauer, 1990, Concha y col, 2005). Estudios más recientes, también realizados en nuestro laboratorio, han demostrado la expresión de apoA-I en la piel de este pez donde tendría una activa participación en el sistema de defensa primario. (Concha y col, 2003 y 2004).

ApoA-I, corresponde al 70% del contenido proteico de HDL (Herbert y col, 1987), es responsable de la formación, maduración y del metabolismo de esta partícula. Actualmente se conoce que HDL constituye una familia altamente heterogénea en circulación, las cuales se definen por cantidades y composiciones variables de lípido y proteína. La HDL naciente, es una partícula discoidal compuesta de proteínas, fosfolípidos y pequeñas cantidades de colesterol. En contraste, la HDL madura es una partícula esférica que consiste en un 50 % en peso de lípidos (principalmente fosfolípidos, colesterol, ésteres de colesterol y triglicéridos) y el otro 50 % en peso de proteína.

HDL, por su heterogeneidad en el plasma puede ser clasificada según su migración electroforética (HDL con migración α o con migración pre- β) o según su densidad como HDL₂ (ρ = 1,063-1,125 g/cm³) y HDL₃ (ρ = 1,125-1,21 g/cm³) (Lindstedt y col., 1999). Las diferentes poblaciones de partículas conteniendo apoA-I cumplirían papeles distintos en la movilización de colesterol. La primera etapa en este proceso involucraría la remoción de fosfolípidos y colesterol de la membrana plasmática. Se han postulado al menos dos mecanismos por los cuales se lleva acabo este proceso, uno

de ellos es el mecanismo conocido como difusión acuosa, en donde el colesterol removido de la membrana difunde por el medio acuoso hasta la lipoproteína receptora. El mecanismo conocido como micro-solubilización de membrana en el cual se involucraría una interacción entre la apoA-I libre de lípidos o la apoA-I de la partícula de HDL pobre en lípidos (pre- β), con la membrana plasmática, promoviendo la remoción secuencial de fosfolípidos y colesterol desde la membrana plasmática (Phillips y col., 1998; Gillotte y col., 1999). En este proceso se forman HDLs con forma discoidal que luego por la acción de la enzima LCAT, transforma a la HDL discoidal en esférica la cual presenta migración α . Esta HDL en circulación es la que intercambia apolipoproteínas, como apoA-II, con otras lipoproteínas.

Estudios han demostrado que además de los mecanismos mencionados anteriormente, proteínas de membrana modularían la captación selectiva de lípidos y colesterol entre la partícula lipoproteíca y la membrana plasmática. Este seria el caso del receptor SR-B1 (scavenger receptor B1). y del transportador ABCA-1 (adenosine triphosphate-binding cassette protein A-I), como se vio en el TRC, en donde el primero localizado principalmente en hepatocitos estaría participando en un proceso que involucraría 2 pasos. Primero se produciría una unión de alta afinidad entre el receptor y la partícula lipoproteíca seguida de la transferencia de lípidos mediada por el receptor desde la lipoproteína a la membrana celular. Luego de ser depletada de lípidos, las apolipoproteínas presentes en HDL son liberadas de la membrana hacia el espacio extracelular (Krieger, 2001). El transportador ABCA1, es una molécula recientemente asociada a la enfermedad de Tangier. En esta patología se detectan bajos niveles de HDL plasmáticos, acumulación de ésteres de colesterol en macrófagos tisulares y un

mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares (Francis y col., 1995; Lin, 2002). Esta molécula, ha sido postulada como participante en la remoción de colesterol mediada por apolipoproteínas desde las células. Sin embargo, algunos investigadores no encuentran esta unión y atribuyen tal interacción a una redistribución de lípidos de membrana inducida por el transportador lo que generaría un micro ambiente en la membrana facilitando de esta forma el anclaje de la apolipoproteína (Chambenoit y col., 2001; Corsico y col., 2001). Estudios recientes realizados por Ishida y col (2004), han involucrado a la proteína cubilina en la endocitosis de HDL en células epiteliales de rata, corroborando antecedentes previos que mostraban a cubilina como un receptor endocítico para HDL (Hammad y col., 1999; Kozyraki y col., 1999).

La secuencia nucleotídica del cDNA de apoA-I ha sido determinada en varias especies y se ha establecido que estos codifican para proteínas cuyo tamaño varia entre 258 a 267 aminoácidos (proteína completa que incluye el segmento pre-pro). La comparación de secuencia entre mamíferos muestra que el extremo amino terminal es altamente conservado mientras la zona central y carboxilo terminal muestran principalmente sustituciones conservativas entre las especies (Frank y Marcel, 2000).

ApoA-I de humano posee un 48 % de identidad y un 68 % de homología con apoA-I de pollo (Kiss y col., 1999), mientras que con especies más alejadas evolutivamente como los peces, tanto la identidad como la homología son mucho menores. Sin embargo, a pesar de esta falta de homología entre distintas apoA-I, en todas las apoA-I secuenciadas se pueden identificar repeticiones de 11 y 22 aminoácidos. Estas últimas están generalmente delimitadas por un residuo prolina y de acuerdo a las predicciones de estructura secundaria realizadas, estas repeticiones presentarían una estructura de α-hélice de características anfipáticas (Frank y Marcel, 2000), lo que sumado a la alta flexibilidad estructural que muestra apoA-I libre de lípidos o asociada a otras partículas, le otorgan a esta proteína una gran capacidad de unión a lípidos.

Los datos proporcionados por Borhani, (1997) (Figura 2), al cristalizar la apoA-I Δ (1-43) humana a una resolución de 4 Å, fragmento que une lípidos de una forma similar a la apoA-I intacta y que además retiene la conformación unida a lípidos en la ausencia de estos, aportó con antecedentes muy importantes para establecer una relación entre la estructura y la función en esta proteína.

En peces, la movilización de lípidos es realizada por lipoproteínas, las cuales han sido clasificadas en forma análoga a las detectadas en vertebrados superiores. De hecho, en la mayoría de los peces teleósteos se han detectado las lipoproteínas del tipo VLDL, LDL y HDL (Chapman, 1980; Babin y Vernier, 1989). Una particularidad de la mayoría de los peces teleósteos es la ausencia de una albúmina típica en el plasma (aún en controversia en algunas especies), siendo las lipoproteínas las que predominan

A su vez, entre las distintas lipoproteínas del plasma es la HDL la que presenta mayor concentración, constituyendo en algunas especies como en la carpa el 90 % de la fracción lipoproteíca, alcanzando concentraciones de 1 a 2 g/dl. Esto otorga una mayor relevancia funcional a esta proteína en este sistema, ya que estaría supliendo actividades características de la albúmina como por ejemplo el transporte de ácidos grasos libre (De Smet y col., 1998; Metcalf y col 1999).

Además, los antecedentes entregados por estudios utilizando mutantes naturales y artificiales en apoA-I humana, han hecho posible esclarecer en parte, la función de



Figura 2. Representación en cinta del tetrámero apoA-I Δ (1-43) de humano visualizada desde distintos ángulos. Molécula A en oro, B en púrpura, C en rosa y D en verde. Las cuatro moléculas se asocian por sus caras hidrofóbicas para formar una estructura con forma de anillo elíptico. Es necesario aclarar que actualmente se acepta a apoA-I como un dímero y no como un tetrámero.

cada una de las regiones de apoA-I, encontrando que las regiones N y C terminales comprendidas entre los residuos 44-65 y 210-241 respectivamente, serian importantes en la interacción inicial con lípidos. Las hélices centrales comprendidas entre los residuos 100-121 y 122-143 también serian importantes en la unión a lípidos y en la formación de la HDL madura, mientras que las hélices entre los residuos 144-186 contribuyen poco. El dominio de activación de LCAT ha sido claramente asignado a la hélice 144-165 con una contribución secundaria de la hélice 166-186. El C-terminal reconocido por ser importante en la unión a lípidos, también esta involucrado en la mantención de HDL en la circulación, en la interacción de apoA-I libre de lípidos con macrófagos y el eflujo de lípidos (Frank y Marcel, 2000). También se ha atribuido a esta región la actividad antimicrobiana de apoA-I, por su similitud estructural con péptidos antimicrobianos los cuales poseen un marcado carácter de alfa hélice anfipática, altamente catiónica (Concha y col, 2004).

De acuerdo a estos antecedentes entregados anteriormente es posible plantear la siguiente hipótesis:

Las variaciones de secuencia entre las apolipoproteinas A-I de distintas especies determinan las características estructurales generales, sin embargo le confieren características funcionales particulares que serian importantes en la interacción con membranas celulares determinando entre otros aspectos la capacidad de extraer colesterol. Según esto, nos propusimos evaluar en esta tesis los siguientes objetivos generales y específicos:

- 1. Obtener secuencia completa del cDNA para apoA-I de carpa.
 - 1.1. Diseñar la estrategia para obtener clones que contengan la secuencia Nterminal de apoA-I, desde una genoteca de cDNA de hígado de carpa.
 - 1.2. Rastrear la biblioteca de cDNA de carpa.
 - 1.3. Caracterizar clones obtenidos.
 - 1.4. Secuenciar y analizar la secuencia del cDNA de apoA-I de carpa.
- 2. Caracterizar la interacción de apoA-I con lípidos.
 - 2.1. Purificar apoA-I de carpa y humana.
 - 2.2. Analizar la interacción de apoA-I con vesículas de fosfolípidos.
 - 2.3. Analizar la interacción de apoA-I con membranas celulares.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1 MATERIALES.

En Merck fueron adquiridos: EDTA, Tris, Citrato de sodio, Cloruro de sodio, ácido tricloroacético, formamida, mezcla de centelleo líquido (PPO 4 g/l, POPOP 0.1 g/l), agar-agar, peptona de caseina, extracto de levadura, sacarosa, pirofosfato de sodio, cloroformo, isopropanol, etanol, eter, metanol, Triton X-100, acetato de sodio, glicerol, azul de bromofenol, bromuro de potasio, tiocianato de sodio, urea, azida de sodio, benzamidina, PMSF, Acrilamida, N, N'-Metilenbisacrilamida, glicina, 2-mercaptoetanol, ácido clorhídrico, fosfato de sodio, fosfato de potasio, SDS, TEMED, xilol, papel filtro.

Invitrogen-Gibco BRL, Inc., se adquirieron, agua destilada libre de DNAsa y RNAsa, las enzimas de restricción *EcoR*I, *Xho*I, *Sma*I y *Kpn*I 10 U/µI c/u, dNTPs 10 mM c/u, membrana de nitrocelulosa, estándar de tamaño molecular λ DNA/*Hind*III, DNA Taq polimerasa 5 U/µI, DNA pol I/DNasa I 0,4 U/µI, TrizoI, anticuerpo anti-IgG de conejo producido en cabra conjugado con fosfatasa alcalina, NBT, BCIP, estándar de peso molecular para electroforesis en geles de poliacrilamida (Protein ladder Benchmark).

El anticuerpo anti IgG de conejo hecho en cabra y conjugado con Alexa 488 fue adquirido en "Molecular Probe".

En NEN se adquirió [α^{32} P]-dCTP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml)

En Promega se adquirió la enzima M-MLV reverse trancriptase (10.000 U), RNAsin[®], kit Wizard DNA purification, Sistema polyATtract® III.

Las placas petri 100x15 mm son Falcon.

En Kodak fueron adquiridos los films radiográficos, solución reveladora y fijadora. Los filtros 0.45 µm son ADVANTEC MFS. DMPC fue adquirido en AVANTI POLAR-LIPIDS, INC.

En Indura se adquirió el Nitrógeno.

En Bio-Rad fue adquirido la resina Affi-Gel[®] blue (Cibacron blue), Tween 20, azul de Coomasie brillante R-250, persulfato de amonio.

En Sigma Chemical Company se adquirió bromuro de etidio, heparina, ácido 8anilino-1-naftaleno sulfónico (ANS), Sephacryl S-200 HR, ácido aminocaproico, levamisol.

Membranas Inmobilon-P fluoruro de polivinilideno (PVDF) fueron adquiridas en MILLIPORE.

Los solventes orgánicos, metanol, isopropanol y ácido acético de grado técnico para teñir y desteñir geles de poliacrilamida fueron adquiridos en Equilab.

En Stratagene se adquirió la biblioteca de cDNA de hígado de carpa construida a partir de la fraccion Poli A+ (mRNA) de hígado de carpa (*Cyprinus carpio*) y clonado en el plásmido Uni-ZapTM XR. También las células XL-1-Blue MRF, la cepa SolRTM y el fago ayudante ExAssistTM.

El oligonucleotido para la síntesis de la sonda utilizada en el rastreo con secuencia 5'-CGT TCT GAA AGT AGC CGT GGA G-3' fue fabricado en IDT integred DNA technologies, INC, USA.

3.2 METODOS.

3.2.1 Rastreo de clones conteniendo la secuencia completa de apoA-l de carpa.

3.2.1.1 Cálculo del título de la biblioteca de cDNA de hígado de carpa.

El titulo de la biblioteca se calculó preparando 3 diluciones del stock de fagos, 1/500, 1/1.000 y 1/5.000. Se tomaron 300 µl del cultivo exponencial de la cepa XL1-blue para 1 µl de c/u de las diluciones de la biblioteca en medio SM, esta mezcla se agitó suavemente para facilitar la absorción de los fagos a la superficie de la bacteria y se incubó a 37°C por 15 minutos. Una vez cumplido el tiempo se agregó 3 ml de NZY-top agar [para 1lt, NaCl 5 g; MgSO₄ 2 g; Extracto de levadura 5 g; digerido enzimático de caseina (NZ-amine) 10 g; agarosa 0,7 % P/V; pH 7,4], previamente fundido, a una temperatura aproximada de 50°C, se mezcló y se vertió sobre las placas NZY [por 1lt, NaCl 5 g; MgSO₄ 2 g; Extracto de levadura 5 g; digerido enzimático de caseina (NZamine) 10 g; agar 15 g; pH 7,4]. Una vez solidificado el NZY-top agar se llevó a 37°C por 4-5 h. Luego del tiempo de incubación se contabilizaron las ufp o unidad formadoras de placa y el título se calculó según la dilución correspondiente.

3.2.1.2 Síntesis de sondas radioactivas.

El DNA contenido en los fagos fue rastreado con una sonda radioactiva sintetizada según la técnica de "nick translation", cuya estrategia es comentada con más detalle en esta sección. Para los análisis Southern blot se utilizó una sonda radioactiva de una hebra, sintetizada a partir de la extensión de un oligonucleotido complementario a la región 5' del clon parcial de apoA-I de carpa (Q98SI3).

3.2.1.2.1 Purificación de RNA total por el método de Trizol

La purificación de RNA total se efectuó por el método de Trizol descrito por Chomczynski y Sacchi (1987). Las muestras de tejidos se colocaron en un tubo estéril y se homogeneizaron en 1 ml de Trizol utilizando un politrón (Ultraturrax). Una vez homogeneizadas, éstas se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente, para permitir la disociación completa de los complejos de nucleoproteínas. Luego se adicionó 0,2 ml de cloroformo por cada mililitro de Trizol, se agitó vigorosamente en Vortex por 15 seg e incubó a temperatura ambiente por 2 a 3 min. Posteriormente, las muestras se centrifugaron en tubos Eppendorf a no más de 12.000 x g durante 15 minutos, a una temperatura de entre 2 a 8ºC. Luego de la centrifugación, se separó la mezcla en una fase orgánica roja (inferior), en una interfase (precipitado blanquecino) y en una fase acuosa superior incolora. Se removió cuidadosamente la fase acuosa cuidando de no contaminarla. El volumen final de la fase acuosa correspondió aproximadamente al 60 % del volumen inicial de Trizol. La fase acuosa se transfirió a un tubo Eppendorf estéril, luego se precipitó el RNA desde esta fase usando 0,5 ml de isopropanol por ml de Trizol. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente por 10 minutos y se centrifugaron a no más de 12.000 x g por 10 minutos a 4ºC. El RNA precipitado formó un gel en el fondo del tubo .El sobrenadante fue removido y el sedimento (RNA) se lavó con etanol 75 %, la muestra se mezcló en agitador Vortex y se centrifugó a no más de 7.500 x g durante 5 minutos a 4°C eliminando luego el etanol. Finalmente, el sedimento de RNA se dejó secar a temperatura ambiente por 10 minutos, sin dejar que se seque completamente, para no dificultar su posterior disolución. El RNA obtenido se resuspendió en tampón TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM, pH 8,0) tratado con DEPC, por medio de pipeteos suaves. Por último, se estimó el grado de pureza y la concentración del RNA por espectrofotometría a 260 nm y luego se almacenó a –20°C en alícuotas.

3.2.1.2.2 Purificación de mRNA a partir de RNA total de hígado de carpa.

Para la obtención de mRNA se usó RNA total de hígado de carpa, como se describe en el punto 3.2.1.2.1 y se utilizó el sistema polyATtract® III. El RNA total debe ajustarse de manera que contenga entre 0,1-1 mg de RNA total en 500µl de agua libre de RNasa. Luego, el RNA fue calentado a 65 °C por 10 min. Una vez desnaturado el RNA, se adicionó 3 µl de oligo-dT-biotinilado y 13 µl de SSC 20x para que se produzca el apareamiento entre el oligo y la cola de poli-A+ de los mRNAs. La mezcla se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Para realizar la captura de los híbridos oligo-dT-(RNAs-poliA+) se utilizaron partículas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina, las que se trataron previamente resuspendiéndolas y capturándolas en un soporte magnético. El sobrenadante se removió y las partículas se lavaron tres veces con 0,3 ml de SSC 0,5x, los lavados fueron eliminados capturando cada vez las partículas en el soporte magnético durante 1min. Finalmente, se resuspendieron las partículas en 100 µl de SSC 0,5x y se le adicionó la mezcla que contienen los RNAs poliA+ unidos, incubándose a temperatura ambiente por 10 minutos, mezclando por inversión cada 2 minutos, se capturaron las partículas usando el soporte magnético y se eliminó el sobrenadante. Se lavaron las partículas 4 veces con 300 µl de SSC 0,1x. Finalmente, se resuspendió el precipitado en 100 µl de agua libre de RNasa y se capturaron magnéticamente las partículas, transfiriendo el mRNA eluído a un tubo estéril, se repitió el paso de elusión y se transfirió al mismo tubo. Por último, se estimó el grado de pureza y la concentración del mRNA por espectrofotometría.

3.2.1.2.3 Síntesis sonda radiactiva una hebra.

El marcaje de esta sonda se realizó mediante la extensión, por la transcriptasa reversa, del oligonucleotido complementario al extremo 5' del clon parcial de apoA-I. Se incubó 1 µl de oligonucleotido 95 µM y 12 µl de mRNA poliA+ por 10 minutos a 70°C para permitir el despliegamiento del mRNA y posteriormente se enfrió rápidamente en hielo. Se adicionó 1 µl de RNAsin[®] (inhibidor de ribonucleasas); 4 µl de buffer 5X primera hebra; 1 µl dNTP-dCTP 10 mM c/u y 2 µl de [α^{32} P]-dCTP 20 µCi, se mezcló y se incubó por 2 minutos a 42°C permitiendo de esta forma el apareamiento de la sonda con el mRNA, posteriormente se agregó 1 µl de la enzima M-MLV RT (200 U/µl) y se incubó por 25 minutos a 42°C para realizar la extensión incorporando el [α^{32} P]-dCTP y el resto de los desoxinucleotidos fríos. Finalmente se agregó 1 µl de dCTP frio (10 mM), se incubó por 45 minutos a 42°C para terminar la extensión y se llevó a 70°C por 15 minutos para inactivar la transcriptasa reversa. El cDNA hebra simple se guardó a - 20°C.

3.2.1.2.4 Síntesis de sonda radiactiva doble hebra.

Esta sonda fue marcada utilizando la técnica de "nick translation" en el cual se utilizó 175 ng (17,5 µl) del inserto purificado correspondiente al clon parcial de apoA-I de carpa de 937 pb, más 5 µl de buffer 10x (Tris-HCl 0,5 M, pH 7,8; MgCl₂ 50 mM), 10 µl de dNTP-dCTP 250 µM c/u; 5 µl [α^{32} P]-dCTP 50 µCi; 5 µl DNA polimerasa I/DNAsa I; 3,5 μ I β -MeSH 140 nM; 4 μ I H₂O libre de nucleasas. La mezcla fue incubada a 16°C por 1h 30 minutos y posteriormente se detuvo la reacción en frío agregando 1 μ I de EDTA 0,5 M, pH 8,0 y luego la mezcla se calentó a 70°C por 10 minutos.

3.2.1.3 Cuantificación de las sondas mediante cuentas TCA precipitables.

La cuantificación se realizó tomando 1 µl de la sonda y se diluyó con 99 µl de agua destilada estéril. De esta dilución se tomaron 10 y 20 µl., se agregó 5 ml de TCA 10 % con pirofosfato de sodio frío y 10 µg de DNA de timo de ternera como "carrier"/tubo. Se hizo un tubo control solo con DNA "carrier". Luego de mantener los tubos por 10 minutos en hielo, la solución contenida en cada tubo se filtró al vacío con filtros de nitrocelulosa de 25 mm de diámetro NC S&S 0,45 µm de poro, se enjuagó el tubo 3 veces con TCA 10% y luego se enjuagó el filtro con etanol absoluto. Los filtros se secaron en estufa a 80°C al vacío por 5 minutos y luego se transfirieron a viales conteniendo 5 ml de mezcla de centelleo precipitable (PPO 4 g/l y POPOP 0,1 g/l, disueltos en tolueno) y se contaron por 1 minutos en el contador de centelleo Packard Tri-Carb 1600TR. La actividad específica en cpm/µg de sonda se calculó considerando las cuentas incorporadas y la cantidad de sonda utilizada.

3.2.1.4 Rastreo del cDNA de largo completo para apoA-I de carpa.

3.2.1.4.1 Obtención de las unidades formadoras de lisis (ufp).

Una vez crecidas las colonias de la cepa XL1-blue MRF en placas LBtetraciclina, se eligió una colonia aislada y se inoculó en 15 ml de medio LB conteniendo maltosa 0,2 % + MgCl₂ 10 mM, este medio se incubó a 37°C con agitación constante hasta la etapa de crecimiento exponencial con una DO de 0,5 a 620 nm. Al lograr esta densidad el cultivo fue centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante cuidadosamente y el sedimento se resuspendió en 15 ml de MgSO₄ 10 mM para obtener una absorbancia aproximada de 0,5 a 620 nm. De esta suspensión bacteriana se tomó 200 µl y se le adicionó 6 µl de la biblioteca Uni-ZapTM XR diluida 1/1.000, se agitó suavemente para favorecer la absorción de los fagos a las bacterias y se incubó a 37°C por 15 minutos. Luego de la incubación se agregó 3 ml de "NZY-top agar" a 45°C aproximadamente, se mezcló y vertió sobre placas NZY. Una vez solidificado el agar se incubó a 37°C por 4-5 h para la obtención de las ufp.

3.2.1.4.2 Transferencia de las ufp a membranas de nitrocelulosa.

Una vez obtenidas las ufp, las placas NZY fueron enfriadas a 4°C por 10 minutos para endurecer el top-agar. Se tomaron las membranas de nitrocelulosa previamente rotuladas con lápiz grafito y fueron extendidas sobre el agar evitando la formación de burbujas o arrugas al humectarse con el agar. Se dejó transfiriendo el DNA por 1 minuto, mientras tanto con una aguja hipodérmica estéril se realizaron 3 orificios asimétricos que atravesaron tanto el filtro como el agar, luego con un lápiz permanente se marcaron los orificios en la superficie de la placa. Estos orificios deben encontrarse distribuidos asimétricamente en la periferia de la placa para que de esta forma se facilite la orientación del filtro sobre la placa. Luego de un minuto de incubación, el filtro se sacó cuidadosamente con ayuda de una pinza y se depositó por 2 minutos en una fuente con papel filtro embebido con solución de denaturación (NaCl 1,5 M; NaOH 0.5 M) cuidando que la cara que estuvo en contacto con el agar quede hacia arriba. Luego

los filtros fueron transferidos por 5 minutos a una fuente con solución de neutralización (NaCl 1,5 M; Tris-HCl 0,5 M, pH 7.5) en las mismas condiciones que el paso anterior. Finalmente los filtros fueron secados y fijados dentro de una estufa con vacío a 80°C por 2 h.

3.2.1.4.3 Prehibridación e hibridación de las membranas.

Para bloquear las membranas, los filtros son incubados por 2 h con solución de prehibridación [SSC 20x (para 1 lt, NaCl 175.3 g; citrato de sodio 88.2 g; pH 7,0); formamida desionizada 50 %; Denhart 5x (para 0,5 lt de 100x, Ficoll 400 10 g; Polivinilpirrolidon 10 g; BSA 10 g), SDS 0.5 % (p/v)] dentro de bolsa de hibridación Gibco-BRL a 42°C. Una vez realizado este paso, se procedió a incubar con la solución de hibridación (solución de prehibridación más sonda radiactiva previamente denaturada a 94°C por 5 min y enfriada inmediatamente en hielo) a 42°C toda la noche. Se utilizó 20 µl de la sonda una hebra y 50 µl para la sonda doble hebra en 15 ml de solución de hibridación.

3.2.1.4.4 Lavados y exposición de los filtros.

Las membranas incubadas con la sonda fueron lavadas a máxima estrictez. Primero se realizaron 3 lavados con solución SSC 2x; SDS 0,5 % (p/v) a temperatura ambiente y 3 lavados al igual que el anterior, pero a 37°C. Luego se realizaron 3 lavados más con solución SSC 1x; SDS 0,5 % (p/v) a 56°C. Cada uno de los lavados fue realizado en un volumen de 250 ml. Posteriormente, en cámara oscura y bajo luz roja los filtros fueron puestos en contacto con un film fotográfico dentro en un casete de exposición. La exposición fue realizada a -70°C por 22h.

Una vez finalizado el tiempo de exposición se procedió al revelado del film. Esto se realizó, como en el paso anterior, en pieza oscura y bajo luz roja. Se utilizaron 3 bandejas conteniendo en cada una solución reveladora D-72, agua y solución fijadora U-3 Kodak respectivamente. El film fue extraído del casete de exposición y puesto en contacto primero con la solución reveladora hasta comenzar a ver marcas. Luego el film se sumergió brevemente en agua y finalmente en la solución fijadora. El film fue secado.

3.2.1.4.5 Recolección de los clones positivos.

El film fue alineado con su respectiva placa y las ufp fueron seleccionadas de acuerdo al aislamiento e intensidad de la marca en el film. Las ufp seleccionadas fueron rotuladas con lápiz permanente sobre la placa para su posterior recolección.

Para la recolección de las ufp, se utilizó una pipeta pasteur conectada a una manguera, a través de su extremo más fino. El extremo más ancho de la pipeta se insertó en la zona del agar seleccionada, de tal forma que la ufp junto con el agar dentro de la pipeta fueran posteriormente extraídas de la placa con una leve succión a través de la sonda, evitando arrastrar ufp vecinas. Una vez obtenida la ufp, esta fue depositada en un microtubo de 1,5 ml conteniendo 1 ml de solución SM (por litro, 5,8 gr NaCl; 2,0 gr MgSO₄; 50 ml Tris-HCl 1 M pH 7,5 y 5,0 ml gelatina 2 % (p/v)) y 20 µl de cloroformo.

3.2.1.5 Rastreo secundario.

Las ufp seleccionadas del rastreo primario fueron sometidas al rastreo secundario y posteriormente a un terciario, donde a cada una de ellas se les realizó el procedimiento antes descrito (sección 3.2.1.4). De esta forma se incrementó la pureza de los fagos seleccionados.

3.2.1.6 Amplificación de las ufp seleccionadas y obtención del plásmido recombinante para apoA-I de carpa.

Se preparó un cultivo exponencial de la cepa XL1-blue a partir de 250 µl de un cultivo crecido durante toda la noche, en 25 ml de medio LB hasta una DO de 0,5 a 600 nm. Este cultivo se centrifugó a 1500 x g durante 5 minutos y el pellet se resuspendió con MgCl₂ 10 mM hasta alcanzar una DO de 1,0 a 600 nm. Luego, en un tubo cónico de 15 ml se agregó 200 µl del cultivo anterior, 250 µl de fagos y 1 µl de EXassist (fago que facilita la excisión in vivo del fagémido contenido en el fago). Esta mezcla se incubó a 37°C por 15 minutos. Luego, se agregó 3 ml de medio LB y se incubó por 6 h a 37°C con agitación. Posteriormente, la suspensión se centrifugó a 2000 x g por 15 minutos, el sobrenadante se transfirió a 2 microtubos de 1,5 ml los cuales fueron incubados a 70°C por 15 minutos. Luego estos se centrifugaron a 4000 x g por 15 minutos y el sobrenadante fue transferido a un microtubo estéril correspondiendo esto al "stock" de p-bluescript empaquetado como fago filamentoso (fagémido). Se guardó a 4°C.

Posteriormente, se creció un cultivo de la cepa SolR hasta una DO de 0,5 a 600 nm. De este cultivo se tomó 200 μ l más 1 μ l del stock de fagémido y fueron mezclados en un microtubo de 1,5 ml. Se sembró 30 μ l de esta suspensión en placas LB/ampicilina

50 μg/ml. Las colonias aisladas resistentes obtenidas se crecieron en 3 ml de medio LB/ampicilina 100 μg/ml toda la noche a 37°C con agitación, para la posterior extracción del DNA plasmidial por el método de ebullición ("boiling").

3.2.1.7 Obtención de DNA plásmidial por método de ebullición.

La mitad del cultivo anterior se transfirió a un microtubo de 1,5 ml, se centrifugó a 5000 rpm por 3 minutos, se eliminó el sobrenadante y sobre el pellet se transfirió la otra mitad del cultivo centrifugando esto como en el paso anterior y eliminando el sobrenadante. El pellet bacteriano se resuspendió por agitación con vortex en 110 µl de solución de lisis STETL [(sacarosa 8 % (p/v); Tris-HCI 50 mM, pH 8,0; EDTA 50 mM; Tritón X-100 5 % (v/v)] y lisozima 0,5 mg/ml, esta ultima fue adicionada justo antes de usar. La suspensión se hirvió a baño maría (100°C) durante 1 minutos, se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante fue transferido a un microtubo limpio y se mezcló con un volumen igual de isopropanol, mezclando por agitación suave por algunos segundos. Luego, se centrifugó por 15 minutos a 13000 rpm, se aspiró el sobrenadante cuidadosamente y se le adicionó 0,5 ml de etanol 70%. La suspensión fue centrifugada brevemente para eliminar el exceso de etanol y se dejó secar a 37°C por 15 minutos. Finalmente el DNA se disolvió en 25 µl de tampón TE pH 8.0 (Tris-HCI 10 mM; EDTA 1 mM).

3.2.1.8 Digestión del DNA mediante enzimas de restricción.

La digestión se realizó utilizando las enzimas, Smal y Kpnl. La reacción se realizó en un volumen final de 20 μ l de una mezcla conteniendo 5 μ l de DNA plasmidial,

2 µl de tampón React 4 10x de Gibco-BRL (Tris-HCl 20 mM, MgCl₂ 5 mM, KCl 50 mM, pH 7.4) y 7 µl de agua desionizada libre de nucleasas. Se agregó 1 µl de *Kpn*l 10 U/µl incubando por 1 hora a 37°C y luego se agregó 1 µl de *Sma*l 10 U/µl y se incubó por una hora más a 30°C.

3.2.1.9 Amplificación de DNA mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Antes de comenzar el análisis se limpio muy bien cada una de las pipetas a utilizar con alcohol 70 %, al igual que el mesón de trabajo. Además se utilizaron puntas estériles libres de nucleasas.

Los volúmenes utilizados para las muestras a amplificar correspondió a: 1 μ l de DNA plasmidial dilución 1/100 (midipreps), 1 μ l de H₂O libre de nucleasas como control negativo, 1 μ l del clon parcial de apoA-l de carpa dilución 1/100 como control positivo. Para amplificar el inserto contenido en el vector p-Bluescript se utilizaron partidores universales T3 y T7 que flanguean el sitio de múltiple clonamiento del vector.

Para el chequeo de la secuencia específica para apoA-I de carpa se utilizaron los partidores apo1 y apo2 cuya secuencia correspondió a la siguiente:

Apo1: CTC CAC GGC TAC TTT CAG AAC G. Tm a 50 mM Na⁺= 52° C.

Apo2: CCC TTC TCC ATC TGC TCC CTA TAA. Tm a 50 mM Na⁺= 52° C.

La mezcla de reacción para cada reacción de amplificación correspondió a:

2 µl buffer 10x (Tris-HCl 200 mM, pH 8,4; KCl 500 mM); 0,6 µl MgCl₂ 50 mM; 0,4 µl dNTPs 2,5mM cada uno; 0,2 µl apo1 14,5 µM; 0,2 µl apo2 14,5 µM; 15,4 µl H₂O; 0,2 µl Taq pol 5 U/µl y finalmente 20 µl de silicone oil.

El programa de amplificación utilizando el termociclador MJ Research modelo PTC-150 fue el siguiente:

- Paso 1: 94°C 3 minutos
- Paso 2: 94°C 1 minuto
- Paso 3: 55°C 1 minuto
- Paso 4: 72°C 1 minuto
- Paso 5: volver al paso 2, 24 veces (25 ciclos)
- Paso 6: 72°C 5 minutos

Finalmente el producto de amplificación se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

3.2.1.10 Electroforesis en gel de agarosa.

Para la visualización de productos de digestión y amplificación se utilizó el método de electroforesis descrito por Sambroock y col (1989). Normalmente se realizaron geles de agarosa entre 0,8 y 1,5 % (p/v) en tampón TAE 1x (Tris-acetato 40 mM; EDTA 1 mM), conteniendo además bromuro de etidio 0,1 mg/ml. El buffer de electrodos correspondió al mismo utilizado anteriormente, pero sin bromuro de etidio y el tampón de carga de las muestras a una solución 6x conteniendo azul de bromofenol 0,25 % (p/v) y glicerol 30 % (v/v). En todos los casos, además de las muestras se incluyó el estándar de tamaño molecular λ DNA/*Hind*III. Los geles se sometieron a una
intensidad de corriente de 100 mA por 45 minutos aproximadamente y luego se visualizó el resultado bajo luz ultravioleta (transiluminador UV).

3.2.1.11 Southern blot.

La transferencia de los fragmentos de DNA separados en electroforesis en geles de agarosa se realizó a una membrana de nylon, procedimiento descrito por Southern, (1975) y modificado por Sambrook et al (1989). Antes del montaje de la transferencia, el gel de agarosa se incubó con una solución denaturante (NaOH 0,5 M y NaCl 1,5 M), con agitación suave por 30 minutos, luego se dejó el gel en una solución neutralizante (Tris-HCl 0,5 M pH 8.0 y NaCl 1,5 M) con agitación suave por 30 minutos. Finalmente el DNA fue transferido por capilaridad a una membrana de nylon con tampón 20X SSC (NaCl 3 M, citrato de sodio 0,3 M, pH 7.0). Se dejó transfiriendo por toda la noche. Finalizada la transferencia, la membrana se lavó con una solución de 1X SSC por 3 minutos. Luego de esto, se fijó el DNA a la membrana, secándola en una estufa con vacío a una temperatura de 80°C por 1 hora. La prehibridación, hibridación y revelado fue realizado según lo descrito en las secciones 3.2.1.4.3 y 3.2.1.4.4.

3.2.2 Purificación de proteínas.

3.2.2.1 Obtención de plasma de carpa.

Sangre de peces vivos fue obtenida mediante punción cardiaca utilizando jeringa heparinizada de 10 ml. La sangre se centrifugó en centrífuga clínica a 2000 rpm por 10 minutos. Al plasma así obtenido se le adicionó inhibidores de proteasas, PMSF 1 mM y Benzamidina 2 mM. Finalmente, se almacenó a -20°C debidamente rotulado hasta su utilización.

3.2.2.2 Obtención de plasma humano.

El plasma humano se obtuvo mediante punción venosa de donantes voluntarios sanos con jeringa de 10 ml heparinizada. El proceso para la obtención del plasma fue idéntico al proceso de plasma de carpa.

3.2.2.3 Purificación de HDL de carpa mediante cromatografía de afinidad.

La purificación de HDL de carpa a partir de plasma se realizó de acuerdo a lo descrito por Amthauer y col. (1988; 1989). Para ello, se montó una columna de Affi-gel blue-agarosa (1,5 cm x 24 cm, Vc = 42 ml), la cual se acopló a un cromatógrafo de baja presión Biologic LP (BioRad). Este instrumento permitió monitorear automáticamente la absorbancia a 280 nm y las fracciones fueron colectadas usando un colector BioRad 2128.

La columna se equilibró con tampón citrato de sodio 50 mM, pH 6,5; NaCl 50 mM y EDTA 2,5 mM. Se aplicó 6 ml de plasma de carpa y se lavó la columna con tampón citrato de sodio 50 mM, pH 6,5; NaCl 350 mM y EDTA 2,5 mM, para eliminar proteínas contaminantes. La proteína retenida se eluyó con tampón de equilibrio conteniendo el fluoróforo ANS 0,06 % (p/v) a un flujo de 1 ml por minuto, colectándose fracciones de 1 ml. Las fracciones obtenidas en la etapa de elusión selectiva con ANS, que mostraron fluorescencia bajo luz ultravioleta, se reunieron en una sola. Esta fracción se dializó contra tampón citrato de sodio 1 mM, pH 6,5; EDTA 0,1 mM; durante aproximadamente

10 horas, realizándose 2 cambios de tampón de diálisis con intervalos de tiempo de aproximadamente 5 h. A la HDL así obtenida se le adicionó los inhibidores de proteasas PMSF 1mM y benzamidina 2 mM. Finalmente parte de la HDL obtenida fue concentrada a una concentración final de proteína cercana a 1 mg/ml y el resto utilizada para obtener apoA-I se llevó a una concentración final de proteínal de proteínas de alrededor 5 mg/ml utilizando un concentrador por medio de vacío (Speed vac).

3.2.2.4 Purificación de HDL humana mediante cromatografía de afinidad.

Para la purificación de HDL de humano, al procedimiento descrito anteriormente (3.2.2.3) se le adicionó un lavado adicional previo a la elusión con ANS, el cual permite la elusión selectiva de albúmina utilizando tampón de equilibrio conteniendo NaSCN 300 mM.

Finalmente, la columna fue regenerada haciendo pasar en forma sucesiva soluciones de: NaOH 20 mM; agua; urea 6 M en NaCl 2 M, agua conteniendo azida de sodio 0,02 % (p/v) para su conservación a 4°C, hasta su uso.

3.2.2.5 Purificación de apoA-l mediante cromatografía de filtración en gel.

A las HDL purificadas de plasma de carpa o humano según corresponda, se les extrajo los lípidos con una mezcla de etanol-eter (3:2 v/v) a -20°C durante toda la noche. La proteína precipitada se recuperó por centrifugación a 6.000 rpm utilizando rotor SS-34 en centrífuga Sorvall RC-5 durante 20 minutos a 4°C. Las lipoproteínas deslipidadas se resuspendieron en el mismo tampón de la columna sin urea y se extrajo

los lípidos por 4 h a -20°C, realizando el mismo procedimiento de deslipidación antes descrito. Finalmente las lipoproteínas deslipidadas fueron resuspendidas en 1,5 ml de tampón Tris-HCl 10mM, pH 8,7; EDTA 1 mM; urea 8 M y fueron fraccionadas en una columna de Sephacryl S-200 (1,5 cm x 90 cm, Vc = 159 ml). La columna previamente equilibrada con tampón Tris-HCl 10mM, pH 8,7; EDTA 1 mM; urea 8 M, se acopló a un cromatógrafo de baja presión BioLogic (BioRad), este instrumento permitió monitorear la absorbancia a 280 nm y las fracciones eluidas son colectadas automáticamente mediante un colector BioRad 2128. Para la etapa de elusión se utilizó el mismo tampón antes mencionado, colectándose fracciones de 0,75 ml a un flujo de 0,25 ml/minutos. Las fracciones correspondientes de apoA-I se reunieron en una sola y se dializaron contra tampón Tris-HCl 5mM, pH 8,7; EDTA 0,1 mM con el fin de eliminar la urea. La purificación lograda a través del proceso antes descrito se evaluó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida.

3.2.2.6 Determinación de concentración de proteínas por el método de Sedmak.

La base de este método es la misma que la del método de Bradford, con la excepción de que se realizan lecturas a dos longitudes de onda con el fin de obtener una razón 595/465 nm que permite linearizar la curva entre concentraciones de 0,5 y 50 µg de proteína por tubo (Sedmak y Grossberg, 1977).

Para este método se utiliza una solución azul de Coomassie G250 al 0,06 % (p/v) en HCl 0,6 N. Dicha solución se filtró y se diluyó con HCl hasta obtener una absorbancia de 1,3-1,5 a 465 nm, que corresponde al máximo de absorbancia para la forma leuko (libre) del colorante.

Se realizó una curva de calibración, con un rango de concentración de albúmina entre 0 a 1 mg/ml. El volumen de muestra utilizado fue de 25 μ l, el cual se diluyó hasta 0,5 ml con una solución de NaCl 0,15 M y posteriormente se le agregó 0,5 ml del colorante. Finalmente se determinó absorbancia a 595 nm y 465 nm y se calculó la A₅₉₅/A₄₆₅ de las lecturas obtenidas, restándole la razón A₅₉₅/A₄₆₅ del blanco de reactivo.

3.2.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) y Western blot.

3.2.3.1 PAGE-SDS.

Las proteínas fueron separadas de acuerdo a su tamaño molecular por PAGE-SDS (Laemmli y col, 1970). Se preparó un gel separador de 7 cm de alto de la siguiente composición: poliacrilamida 12 % (p/v); Tris-HCI 0,375 M pH 8,8; SDS 0,1 % (p/v); persulfato de amonio 0,03 % (p/v) y TEMED 0,1 % (v/v). Sobre este se agregó un gel espaciador de alrededor de 2 cm de alto con la siguiente composición: poliacrilamida 4 % (p/v); Tris-HCI 0,125 M pH 6,8; SDS 0,1 % (p/v); persulfato de amonio y TEMED en iguales concentraciones al gel separador. Ambas partes se prepararon a partir de una solución stock de acrilamida/bisacrilamida 30:0,8% (p/v).

Las proteínas fueron solubilizadas en tampón de muestra constituido por: Tris-HCI 62,5 mM, pH 6,8; SDS 1 % (p/v); glicerol 10 % (v/v) y de azul de bromofenol 0,05 % (p/v), (marcador del frente iónico), en condiciones reductoras (2-mercaptoetanol 5 % (v/v)), por 15 minutos a 4°C. Luego las muestras se calientan a 95°C por 5 minutos. Posteriormente las muestras se hicieron migrar con una corriente de 25 mA hasta que el frente iónico alcanzó el final del gel (alrededor de 3 h). El tampón de electrodos contenía Tris-HCl 25 mM; glicina 0,19 M y SDS 0,1 % (p/v). Finalizada la electroforesis, el gel se fijó en isopropanol 25 % (v/v); ácido acético 10 % (v/v), durante 1 h y posteriormente se tiñó con una solución azul de coomasie R-250 0,3 % (p/v); metanol 30 % (v/v) y ácido acético 10 % (v/v) durante 1 h. Para desteñir el gel, este se hirvió en agua durante 10 minutos en horno microondas a 100 % de potencia.

3.2.3.2 Western blot.

3.2.3.2.1 Electrotransferencia.

electroforesis PAGE-SDS Las proteínas separadas por en fueron electrotransferidas a membranas de Inmobilon-P (PVDF) o membranas de nitrocelulosa utilizando un sistema semiseco (LABCONCO Semy Dry Blotter) de acuerdo al procedimiento descrito por Bolte y col. (1997, 1998). Para la electrotransferencia se siguió el siguiente protocolo: el gel fue equilibrado en tampón de transferencia (Tris-HCI 25 mM, pH 8,3; glicina 0,19 M y metanol 20 % (v/v)) por 15 minutos, transcurrido este tiempo, el gel se depositó sobre la membrana de Inmobilon-P previamente tratada (metanol 100 % (v/v) por 15 segundos; agua destilada por 2 minutos y tampón Tris-HCI 25 mM, pH 10,4; metanol 20 % (v/v) por 5 minutos) o alternativamente sobre una membrana de nitrocelulosa equilibrada por 10 minutos en agua destilada.

La membrana se ubicó hacia el polo positivo de la cámara (ánodo), sobre una hoja de papel filtro Whatmann 3M humedecida en tampon Tris-HCl 25 mM, pH 10,4; metanol 20 % (v/v) debajo de la cual se encontraban 2 hojas de papel filtro humedecidas en tampón Tris-HCl 0,3 M, pH 10,4; metanol 20 % (v/v). Sobre la membrana, se incubó el gel hacia el polo negativo (cátodo) y encima de este se depositaron una a una, 3 hojas de papel filtro humedecido en tampón Tris-HCl 25 mM, ácido aminocaproico 40 mM pH 9,4 y metanol 20 % (v/v).

La transferencia se realizó por 2 h a una intensidad de corriente proporcional al área de la membrana utilizada (factor de proporcionalidad = 0.8 mA/cm^2).

3.2.3.2.2 Inmunodetección.

La membrana, con las proteínas electrotransferidas (3.2.3.3.3), fue bloqueada con una solución que contenía TBS 1X, leche descremada 1 %, Tween 20 0,05 % (v/v) por 1 h a temperatura ambiente con agitación constante. Luego se incubó con el suero anti-apoA-I de carpa hecho en conejo diluido 1/50.000 en la misma solución anterior por 1 h a temperatura ambiente. Para eliminar los anticuerpos no unidos, la membrana fue lavada 3 veces por 3 minutos cada vez, con TBS. Luego se incubó por 45 minutos con el segundo anticuerpo, suero anti-IgG de conejo preparado en cabra y conjugado con fosfatasa alcalina (diluición 1/2.000) en la misma solución en que se diluyó el primero, la agitación se realizó a temperatura ambiente con agitación constante. El exceso del segundo anticuerpo se eliminó realizando 2 lavados por 3 minutos cada vez con solución TBS y se equilibró la membrana con solución tampón para fosfatasa alcalina (Tris-HCl 100 mM pH 9,5; MgCl₂ 5 mM; NaCl 100 mM) por 5 minutos. La actividad fosfatasa alcalina se reveló en oscuridad y a temperatura ambiente con una solución preparada en el momento de su uso la cual contenía los sustratos BCIP 0.17 mg/ml y NBT 0,33 mg/ml diluidos en solución tampón fosfatasa alcalina, el tiempo de revelado es hasta la aparición de bandas de proteínas inmunoreactivas.

La reacción se detuvo lavando la membrana en una solución de EDTA 5 mM por 5 minutos. Finalmente se lavaron las membranas 2 veces por 3 minutos cada vez con agua destilada, dejando secar la membrana a temperatura ambiente en papel absorbente.

3.2.4 Preparación de apoA-l truncada en el extremo carboxilo terminal.

La obtención de apoA-I de carpa truncada en su extremo carboxilo terminal se realizó según lo descrito por Concha y col (2004). Esencialmente, 200 µg/ml de HDL, en buffer bicarbonato de amonio 100 mM pH 7,4; se incubó con quimotripcina pancreática de bovino a una relación molar proteasa : lipoproteína de 1:100 por 210 minutos a 37°C. Transcurrido el tiempo de incubación, la reacción se detuvo a 100°C por 2 minutos. Luego de la adición de inhibidores de proteasas, a una concentración final de PMSF 1 mM y Benzamidina 2 mM, apoA-I de carpa truncada posteriormente fue purificada por el método ya descrito en 3.2.2.5.

3.2.5 Ensayo de solubilización de vesículas multilaminares de DMPC con apoA-I intacta y truncada.

La solubilización de las vesículas multilaminares (mLV) de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) por apoA-I se realizó según lo descrito por Pownall y col. (1978). Esencialmente 0,1 mg de apoA-I fueron agregados a 1 ml de mezcla de reacción conteniendo Tris-HCL 0,01 M, pH 7,4; KBr 8,5 % (p/v); azida de sodio 0,01 % (p/v); EDTA 0,01 % (p/v) y mLV de DMPC 0,5 mg/ml, preincubado a 24°C por 10 minutos. El contenido de la cubeta fue mezclado por 10 segundos y la solubilización de

las vesículas (aclaramiento) fue monitoreado como la disminución de la absorbancia a 325 nm usando un espectrofotómetro Hewlett Packard modelo 8453 de diodo modificado. La diferencia de la absorbancia inicial en el tiempo fue corregida y los valores fueron expresados como porcentaje de la absorbancia inicial a 325 nm.

3.2.6 Análisis bioinformático de apoA-I.

Los análisis correspondientes a la predicción del sitio de corte del pre-pro péptido de la pre-pro-apoA-I de carpa, predicción de estructura secundaria, composición aminoacídica, predicción del coeficiente de extinción molar, peso molecular, punto isoeléctrico se realizaron utilizando el software ANTHEPROT V5.0 (http://antheprotpbil.ibcp.fr/). Los análisis de "helical wheel" fueron realizados con el software "bioedit" (http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html).

Los análisis de alineamiento entre secuencias fueron realizados utilizando Clustal W (1.83) (http://www.ebi.ac.uk/clustalw).

El análisis de predicción de estructura terciaria fue obtenido aplicando un modelo teórico por homología utilizando el servidor de internet EXPASY (expert protein analysis system) (www.expasy.org) y la herramienta "Swiss-Model". El modelo tridimensional obtenido fue visualizado utilizando el visualizador Rasmol (www.umass.edu/microbio/rasmol). La optimización del modelo tridimensional de apoA-I de carpa fue realizado utilizando el software "deep-view" y la herramienta "Swiss-Model" optimice model" (http://swissmodel.expasy.org/).

Las secuencias utilizadas en los análisis fueron obtenidas de la base de datos del Swiss-Prot/TrEMBL (http://au.expasy.org/cgi-bin/sprot-search-de?apoA-I). Los

códigos de accesos corresponden a: ApoA-I humano P02647; Salmo trutta Q91488 (trucha común); Brachydanio rerio O42363 (pez cebra); Oncorhynchus mykiss O57523 (trucha arcoiris); Salmo salar P27007 (salmón atlántico); Anas platyrhynchos O42296 (pato domestico); Coturnix coturnix japonica (codorniz japonesa) P32918; Canis familiares P02648 (perro); Bos taurus P15497 (vaca); Oryctolagus cuniculus (conejo) P09809; Rattus norvegicus P04639 (rata).

3.2.7 Ensayo de unión de apoA-I y HDL a espermatozoides de bovino.

Los espermatozoides eyaculados de bovino fueron obtenidos del centro de inseminación artificial de la Universidad Austral de Chile. Los capilares congelados en nitrógeno líquido conteniendo aproximadamente 60 millones de espermatozoides por mililitro fueron incubados en baño termorregulado a 45°C por 30 segundos. La suspensión de espermatozoides fue depositada en un microtubo de 1,5 ml donde fueron lavados 4 veces con PBS a temperatura ambiente y centrifugando cada vez a 3200 rpm por 2 minutos en microcentrífuga. El sedimento final de espermatozoides se resuspendió en 800 µl de PBS. De esta suspensión se tomó 25 µl por tubo y se le adicionaron 6 µg de HDL y apoA-I respectivamente, completando el volumen a 35 µl con PBS. Cada uno de los tubos fue incubado por 20 minutos a temperatura ambiente. Finalizada la incubación se tomaron 4 µl de la suspensión y se extendieron sobre portaobjetos pre-tratados con poli-lisina, se dejaron 10 minutos a temperatura ambiente, luego 10 minutos a 37°C y por último fueron fijados con Histochoice por 10 minutos a temperatura ambiente.

3.2.8 Inmunocitoquímica en espermatozoides incubados con apoA-I o HDL

El extendido fue bloqueado con BSA 1,5 % (p/v) en PBS por 30 minutos a temperatura ambiente e incubando luego con suero anti-apoA-I de carpa hecho en conejo diluido 1/5.000 en el mismo tampón anterior por 1,5 h a temperatura ambiente con agitación constante. Luego de 3 lavados con PBS se incubó con el segundo anticuerpo, anti-IgG de conejo hecho en cabra conjugado con fosfatasa alcalina y diluido 1/2.000, por 45 minutos a temperatura ambiente y con agitación constante. Luego de 3 lavados adicionales con tampón fosfatasa alcalina conteniendo Tris-HCI 0,1 M, pH 9,5; NaCI 0,1 M; MgCl₂. 5 mM, la actividad fosfatasa alcalina se reveló en oscuridad y a temperatura ambiente. El extendido de espermatozoides fue expuesta por 15 minutos a solución de revelado, preparada en el momento de su uso, conteniendo los sustratos BCIP 0,17 mg/ml y NBT 0,33 mg/ml diluidos en solución tampón fosfatasa alcalina.

La reacción se detuvo lavando los portaobjetos con una solución de EDTA 5 mM por 5 minutos. Finalmente se lavaron 2 veces por 3 minutos cada vez con agua destilada.

Por ultimo las muestras se procedieron a deshidratar haciendo incubaciones sucesivas por 5 minutos cada vez en soluciones conteniendo etanol 80 %; etanol 100 % y Xilol 100 % 2 veces.

3.2.9 Cultivo de células BHK-21.

La línea celular BHK-21 (Baby Hamster Kidney) fue crecida en medio mínimo esencial (MEM)/bicarbonato suplementado con 10 % de suero fetal bovino en un incubador a 37°C y atmósfera compuesta por 95 % aire y 5 % CO₂.

3.2.10 Ensayo de unión de HDL y apoA-I a células BHK-21.

Las células fueron crecidas hasta alcanzar confluencia del 80% en placa de 3,5 mm de diámetro conteniendo 3 "slide cover". El medio fue descartado y las células lavadas 3 veces con PBS. Posteriormente fueron tratadas una solución conteniendo 0,2 mg/ml de HDL o apoA-I en tampón PBS por 20 minutos a 4°C. Las proteínas no unidas fueron lavadas con PBS 3 veces por 5 minutos cada vez y fijadas con paraformaldehido 3 % p/v en PBS por 20 minutos, se retiró el paraformaldehido por succión y las células lavadas 3 veces con PBS.

3.2.11 Inmunocitoquímica en células BHK-21.

Las células se incubaron con PBS conteniendo NH₄Cl 50 mM por 10 minutos a temperatura ambiente, se lavó 2 veces con PBS y 2 veces más con PBS conteniendo gelatina 0,2 % (p/v) por 5 minutos cada vez. Se incubó luego con el primer anticuerpo anti-apoA-l de carpa hecho en conejo dilución 1/5.000 en la misma solución anterior por 1,5 h a temperatura ambiente. Luego de 3 lavados con PBS se incubó por 1 h con el segundo anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a Alexa-fluor 488 dilución 1/400 en solución de incubación. Finalmente se lavó 3 veces con 5 ml de PBS por 5 minutos cada vez y los "slide cover" se montaron con "Dako Fluorescent mounting medium"

sobre porta objeto. Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopio confocal Zeiss LSM5 Pascal facilitado por el Centro de Estudios Científicos (CECS).

3.2.12 Obtención de extracto crudo de membrana plasmática de células BHK-21.

Las células fueron crecidas en placas de 100 mm de diámetro a un confluencia de 95 %. Luego de retirar el medio de cultivo las células se incubaron con 2 ml de PBS conteniendo apoA-I 0,2 mg/ml por 20 minutos a 4°C manteniendo una suave agitación. Luego las células fueron lavadas 3 veces con PBS 5 minutos cada vez a 4°C y se le agregó finalmente 1 ml de tampón de homogenización conteniendo sacarosa 250 mM; Tris-HCI 10 mM, pH 7,4; KCI 50 mM. Con la ayuda de un "cell scraper" las células fueron despegadas de la base de la placa. Una vez que las células se encontraron en suspensión se procedió a homogenizarlas pasándolas por una jeringa de tuberculina con aguja de 25 G 15 veces. El homogenizado es transferido a microtubos de 1,5 ml y centrifugado a 2000 g x 5 minutos en microcentrífuga refrigerada a 4°C. El pellet fue descartado y el sobrenadante se centrifugó luego a 18.620 g x 10 minutos. El pellet correspondiente al extracto crudo de membrana plasmática es resuspendido en 50 µl de tampón conteniendo Tris-HCL 20 mM, pH 7,4; NaCl 75 mM. Como control se realizó una placa con células en las mismas condiciones a excepción de la incubación con apoA-I.

4. RESULTADOS.

4.1 Rastreo del clon conteniendo el cDNA completo para apoA-l de carpa.

4.1.1 Síntesis de sonda radioactiva para el rastreo.

En nuestro laboratorio previamente se contaba con un clon de 937 pb conteniendo parte de la secuencia codificante de apoA-I de carpa, correspondiente ésta al extremo 3' de la secuencia de cDNA. Los estudios de expresión de apoA-I de carpa realizados mediante Northern blot, principalmente en hígado, indicaron que el tamaño del transcrito de apoA-I de carpa correspondía a 1,4 kpb aproximadamente. La estrategia para obtener clones conteniendo la secuencia completa de apoA-I, contempló la síntesis de 2 tipos de sondas radioactivas que fueron utilizadas para rastrear clones a partir de una biblioteca de cDNA de hígado de carpa. La primera correspondió a la sonda de una hebra, cuya estrategia de marcaje radioactivo se encuentra esquematizada en la Figura 3. La segunda sonda correspondió al inserto de la secuencia parcial de apoA-I de carpa, marcada radioactivamente con la técnica de "nick translation".

4.1.2 Rastreo de la biblioteca de cDNA de hígado de carpa.

En el rastreo primario se analizaron un total de 10 placas con aproximadamente 13.000 ufp en cada una. De estas, 5 placas se hibridaron con la sonda una hebra y 5 con la sonda doble hebra. Se seleccionaron 16 y 19 ufp positivas respectivamente para el rastreo secundario, del cual se seleccionaron 24 ufp, las que fueron procesadas según lo descrito en materiales y métodos.



Figura 3. Síntesis de sonda radioactiva una hebra.

Estrategia utilizada para sintetizar la sonda radioactiva una hebra utilizada para rastrear el clon conteniendo la secuencia completa de apoA-I de carpa. **1**, se diseñó un oligonucleótido complementario a la región 5' del clon parcial de apoA-I de carpa. **2**, el oligonucleótido sintetizado es incubado con un extracto total de mRNA poli A+ de hígado de carpa. **3**, en presencia de transcriptasa reversa y nucleótidos marcados radioactivamente, el oligonucleótido ya apareado con el mRNA es extendido hacia el extremo 5' del mRNA de apoA-I, resultando en una sonda de cDNA a la cual fueron incorporados nucleótido radioactivos.

Para cada clon positivo obtenido, la liberación y determinación del tamaño de los insertos contenidos en el DNA plasmidial, se obtuvo mediante digestión con las enzimas de restricción EcoRI y Xhol. Los fragmentos de DNA obtenidos se fraccionaron mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 4). Los clones E-4c, C-2a y B-1a liberaron su inserto, sin embargo a excepción del clon E-4c, los tamaños de inserto resultaron ser similares al inserto del clon parcial. Posteriormente, el clon E-4c también fue descartado al resultar negativo para los análisis de Southern blot y PCR (dato no mostrado). Los clones E-8a, B-3a y C-1a perdieron uno de sus sitios de restricción no liberando inserto. Estos fueron digeridos con 2 nuevas enzimas de restricción, Kpnl y Smal, con sitios de corte más externos, pero adyacentes al sitio de corte de las enzimas utilizadas anteriormente. La visualización de los fragmentos resultantes mediante electroforesis mostró que el clon C-1a liberó un inserto con el tamaño esperado. Luego, la confirmación del tamaño de inserto contenido en el vector fue realizada mediante PCR utilizando los partidores T3 y T7. La visualización tanto del producto de digestión como de amplificación por PCR fue realizada mediante electroforesis en gel de agarosa y es mostrado en la Figura 5.

Una nueva confirmación de que la secuencia contenida en el clon C-1a correspondía efectivamente a apoA-I de carpa se realizó por PCR, esta vez utilizando partidores específicos para apoA-I de carpa. El producto de amplificación resultante se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa, Figura 6.



Figura 4. Análisis de restricción para los putativos clones de apoA-I de carpa obtenidos del rastreo.

Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 %. Los supuestos clones para apoA-I de carpa fueron digeridos con las enzimas de restricción *Eco*RI y *Xho*I. Se observa la liberación del inserto para algunos de estos clones, entre los cuales se incluyen E-4c, C-2a, B-1a y para el clon con la secuencia parcial de apoA-I de carpa. El DNA plasmidial de los clones restantes resultaron sólo linearizados.



Figura 5. Identificación y caracterización del clon con la secuencia completa de apoA-I de carpa.

Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 %. Carriles 1-4 digestión con las enzimas de restricción *Sma*l y *Kpn*l. Carriles 5-7, PCR con partidores T3 y T7. Se observa en el carril 3, la liberación del inserto con un tamaño aproximado de 1,3 Kpb. En el carril 6, se observa la amplificación por PCR del inserto.



Figura 6. Identificación y caracterización del clon de apoA-I de carpa mediante PCR utilizando partidores específicos.

Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % del producto de amplificación del clon C-1a y del clon parcial para apoA-I de carpa. Se utilizando los partidores apo1 y apo2. **Carril 1**, *λHind*III. **Carril 2**, control (-). **Carril 3**, clon C-1a. **Carril 4**, clon parcial apoA-I. La flecha indica el producto de amplificación esperado.

En este análisis se utilizó como control positivo el clon parcial de apoA-I de carpa. Para ambos casos se obtuvo el producto de amplificación esperado de 428 pb.

Finalmente el clon C-1a se analizó mediante análisis de Southern blot. El DNA del gel mostrado en la Figura 5 fue transferido a una membrana de nitrocelulosa para ser luego hibridado con la sonda una hebra marcada radiactivamente. La imagen mostrada en la Figura 7, nos muestra el resultado de este análisis. Tanto el inserto obtenido de la digestión del clon C-1a como los productos de amplificación del clon C-1a y del clon parcial de apoA-I de carpa hibridaron con la sonda. También se observa un producto de amplificación de aproximadamente 1,0 kb en el carril del clon C1a.

Los antecedentes mostrados hasta ahora demuestran de manera concluyente que el inserto contenido en el clon C-1a contiene una secuencia de apoA-I de carpa con un tamaño aproximado de 1,3 kb.

4.2 Análisis de secuencia

Para obtener la secuencia nucleotídica del clon C-1a, el DNA plasmidial obtenido del clon C1a fue purificado mediante kit comercial de midiprep y luego secuenciado. El resultado de esto (Figura 8), arrojó una secuencia nucleotídica de 1323 pb. La secuencia en orientación 5' a 3' posee 202 bp correspondientes a la región 5' no codificante, 774 bp a la región codificante y 347 bp a la región 3' no codificante, además hacia el extremo 3' se encuentra la región de poli A característica de los transcritos primarios. De esta secuencia se encontró un marco de lectura abierto de la cual se dedujo para una proteína codificada por 257 residuos aminoacídicos. Esta proteína presenta el característico péptido de señal para una proteína de secreción localizado en



Figura 7. Identificación y caracterización del clon de apoA-I de carpa por Southern blot.

Autorradiografía del transferido del gel de la Figura 5. Hibridación con la sonda hebra simple y lavados a máxima estrictez. Se indican con flechas continuas la hibridación tanto del clon C-1a como del clon parcial. Con flecha punteada se muestra la presencia de un producto de amplificación intermedio, no detectado en el análisis mostrado en la Figura 5. Las bandas superiores corresponden al plásmido linearizado por las enzimas *Kpn*l o *Sma*l.

GGACGGCACGCTGGCCAGCTTACTGAAACCTTGCTCATGCGGGTGTCGTCAGCCTCAATGCCGACGCTGTCCAGGATCTTCTTGATGTCACC AGCTACAGTAACAGATCC ATG ATG AGG TTC GTA GTC CTC GCC CTC ACT GTT TTG CTG GCA GGC TGC CAG GCC м M т. CGT TTC CTG CAG GAC CAG CCG CCC TCG CAG CTG GAG CAC CTG AAG TCT GCG CTC CAG CTT TAC GCT GAT Q D 0 D R F L Ρ Р S Q L E н L ĸ S Α L 0 L Y Α 19 1 CAG ATG AAG CAG TCG GCA CAC AAA ACC CTC ACT CAC CTC GAC GAC ACA GAG TTC GCA GAC TAC AAG GAA \mathbf{E} D Y ĸ 0 M ĸ 0 S Α н ĸ т - L т н - L D D т E F Α 42 TTC CTG GGC CAG TCT GTG GAC AAC CTC CAC GGC TAC TTT CAG AAC GGC TTC CAA GCC ATC ACC CCA ATT F т. G 0 S v D N ь н G Y F Q N G F 0 Α т т P I 65 GET GAC CAG GTG CTG GAG GCC ACT AAA GAC ACA CGC GAG AAG CTG GTC AAG GAC GTG GAA GAG CTC CGC G D 0 v ь Е Α т Κ D т R Е ĸ \mathbf{L} v к D v Е Е ь R 88 AAG AAG ATC GAG CCC ATG CGC GCG GAG CTC AGG CAG GTG CTG GAG AAG CAC TTA CAG GAG TAC AGA GAC E. P м R Α E. т. R Q v т. E к н т. 0 E Y R D ĸ к т 111 GAG CTG AAG CCT TTC GTC GAG GAG TAC CTG ACC AAA CAT CAA AAG TTC CTG GAG GAG ATG AGG ATC AAG v Е E Y ь т к н Q ĸ F L E Е М R \mathbf{E} ь ĸ Р F Ι ĸ 134 CTG GAG CCT GTG GTC AAG AGC TTG AGA GAG AAG TTT GGA CCC AAC TGG GAG GAG ACC AAG TCC AAG CTG v к S L R Е к G N W Е Е т к L L Е Ρ v F Ρ ĸ S 157 ATG CCC ATC TTG GAG GCT GTG CGC GAG AAG GTG GCG GAG CAT CTC CAG GAC CTG AAG AAA CTG CTG GAG м Ρ I. ь Е А v R Е ĸ v Α Е н ь Q D \mathbf{L} к ĸ ь ь 180 CCC TAC ATG CAG GAT TAT AGG GAG CAG ATG GAG AAG GGA GCC CAG GAG TTC CGC CAG AGC GTG AAA TCT Ρ Υ М Q D Y R E Q М Е к G Α Q Е F R Q S V Κ S 203 GGA GAA CTG AGG AAA AAG ATG AAC GAG TTG GGC GAG GAG GTG AAG CCT CAC TTC GAG GCT ATT TTC GCA Ν Е G Е Е V Е А G E L R Κ Κ М L Κ Ρ н F Α Ι F 2.26 GCC GTC CAA AAG GCC ATT TAC AAG CCG TAA ACC GAC CCT TTT TTA CAC CAT CTC CGC CTC CTT TCT TCC P STOP Κ Α I Y Κ 235

Figura 8. Secuencia nucleotídica y aminoacídica del clon de apoA-l de carpa. Resultado de la secuenciación del clon C-1a. En negro se observa la secuencia nucleotídica y bajo ésta la secuencia aminoacídica deducida. De la secuencia nucleotídica se obtuvieron 1323 pb. Dentro de la secuencia aminoacídica, de 257 residuos, se destaca en magenta el péptido de señal (-22 a -5), en verde la región pro-péptido (-4 a -1) y en azul la proteína madura. Los residuos de prolina se destacan en rojo. en el extremo amino entre la posición -22 y -5. Además del péptido de señal, esta proteína presenta un pro-péptido entre la posición -4 y -1. La proteína madura se encuentra formada por 235 residuos aminoacídicos dentro de la cual se encuentran varias repeticiones de 11 y 22 residuos flanqueados por residuos de prolina.

Una vez obtenida la secuencia de apoA-I de carpa, se procedió a analizar ésta mediante análisis de cladograma, mostrado en la Figura 9. El análisis realizado con las pre-pro-apoA-I de diversas especies del reino animal, resultó concordante con lo esperado, agrupando a apoA-I de carpa muy cerca de su pariente filogenético más cercano, el salmón, mientras que no agrupó con el resto de las especies menos emparentadas.

Con el objeto de comparar las secuencias de las pre-pro-apoA-I de distintos teleósteos, se realizó el análisis mediante alineamiento múltiple, el cual es mostrado en la Figura 10, panel A. Considerando que el alineamiento se realizó entre organismos cercanos evolutivamente, éste resultó en porcentajes de identidad y homología bastante bajos, alcanzando tan solo al 24 y 54 % respectivamente. A pesar de esta baja homología entre secuencias, los residuos de prolina se encuentran conservados en la mayoría de los casos. Del mismo alineamiento de secuencia, se estudio mediante cladograma las relaciones filogenéticas entre estos teleósteos, panel B. El resultado del análisis muestra que del grupo estudiado, apoA-I de carpa es el menos emparentado, ya que no agrupa con ninguna de las especies incluidas en el análisis.



Figura 9. Dendrograma entre diversas secuencias de apoA-I.

Análisis de cladograma entre secuencias de pre-pro-apoA-I de distintas especies del reino animal.

	10	20	30	40	50	60
sa⊥mo_trutta	-MKFLALALTILL	AATQAVPMQ	ADAPSQL	EHVKVAMMEYM	AQVKETGQRS	TDLLDD
Rainbow_trout	-MQFLALALTILL	AAATQAVPMQ	ADAPSQL	EHVKVAMMEYM	IAQVKETAQRS	TDHLDD
Saimo_saiar		AAGTQAFPMQ	ADAPSQL	EHVKAALNMYI	AQVKLTAQRS	
Danio_rerio		ALGSQANLFQ		EHIKAAALVIL		
Auguilla_Japonica		AGSQARFLQ		FULKENLOLVA	DOMKOG A HKI	
cyprinus_carpio	*:*:.****:**		:.*: **	** : * *	*:*:*	: **.
	70	0.0	0.0	100	110	100
	70	80	90	100	110	120
Salmo trutta			I TSOSIACST		AVRAEVMKDV	
Rainbow trout	TEYKEYKVOLSOSI	DNLOOYAOT	ASESLAPYSE	ATGVOLTEATA	AVRAEVMKDV	TEELRSO
Salmo salar	TEYKEYKMOLSOSI	LDNLOOFADS	TSKSWPPTPR	SS-APSCDATA	TVRAEVMKDV	EDVRTO
Danio rerio	TDYEOYKLOLSES	LTKLOEYAOT	TSOALTPYAE	TISTOLMENTK	OLRERVMTD	EDLRSK
Anguilla japonica	TEYKDYKLRLSOS	LDNIÕGYIÕS	ASAAL <mark>SP</mark> YTD	AVSSOFMELTK		DOLKKD
Cyprinus_carpio	TEFADYKEFLGQS	VDNLHGYFQ <mark>N</mark>	GFQAI <mark>TP</mark> IGD	QVLEATK	DT <mark>REKLVKDV</mark>	- EELR <mark>KK</mark>
	*::::** *.:*		: .*	: :	* .: **	
	130	140	150	160	170	180
		1				
Salmo_trutta	LEPKRAELKEVLD	KHIDEYRKKL	E <mark>PLI</mark> KEÍVEQ	RRTELEAFRVK	MEPVVEEMRA	KVSTNV
Rainbow_trout	LEPKRAELKEVLD	KHIDEYRK <mark>R</mark> L	E <mark>PLI</mark> KDIVEQ	RRTELEAFRVK	IEPVVEEMRA	KVSANV
Salmo_salar	LEPKRAELTEVLNI	KHIDEYRK <mark>K</mark> L	E <mark>PLI</mark> KQHIEL	RRTEMDAFRAK	IDPVVEEMRA	K <mark>V</mark> AV <mark>N</mark> V
Danio_rerio	LEPHRAELYTALQ	KHIDEYREKL	E <mark>PVF</mark> QEYSAL	NRQNAEQLRAK	LEPLMDDIRK	AFES <mark>N</mark> I
Anguilla_japonica	LQPKRDELKEVVQI	KHLDEYRAKL	E <mark>PLV</mark> KEYTEK	HKQEMEELKT <mark>k</mark>	LQPVVEDLRA	RIQVNV
Cyprinus_carpio	IEPMRAELRQVLE	KHLQEYRDEL	K <mark>PFV</mark> EEYLTK	HQKFLEEMRIK	LEPVVKSLRE	K <mark>F</mark> GP N W
	::* * ** .::*	**::*** .*	:*::	.: :::*	*********	• *
	190	200	210	220	230	240
Salmo_trutta	EETKAKLMPIVET	V <mark>RAK</mark> LT <mark>ERL</mark> E	E <mark>LRT</mark> LAA <mark>PY</mark> A	.EE <mark>Y</mark> KEQMFK A V	GEVRE <mark>K</mark> VGPI	TNDFKG
Rainbow_trout	EETKAKLMPIVET	V <mark>RAK</mark> LTERLE	E <mark>LRT</mark> LAS <mark>PY</mark> A	.EE <mark>Y</mark> KEQMVK A V	GEVRE <mark>K</mark> VVPI	JTTDFKG
Salmo_salar	EETKTKLMPIVEI	/RAKLTERLE	ELRTLAAPYA	.EE <mark>Y</mark> KEQMFK A V	GEVRE <mark>K</mark> VAPI	SEDFKA
Danio_rerio	EETKSKVVPMVEA	VRTKLTERLE	DLRTMAAPYA	.EE <mark>Y</mark> KEQLVKAV	EEARE <mark>K</mark> IAPH	ITQDLQT
Anguilla_japonica	EETKSKLVPIVEA:	IRAKLTERLE	ELRTLAEPYV	QE <mark>Y</mark> KDHLSEAL	TDVKD <mark>K</mark> VQ	GEDLQS
Cyprinus_carpio	EETKSKLMPILEA	VREKVAEHLQ	D <mark>lkk</mark> lle <mark>py</mark> m	IQD <mark>Y</mark> REQMEK <mark>G</mark> A	QEFRQ <mark>S</mark> VK	SGELRK
	****:*::*::*	:* *::*:*:	:*:.: **	::*:::: :.	1.11.1	:::
	250	260				
		1				
Salmo_trutta	QVGPAA <mark>EQ</mark> AKEKLI	MDFYETİS <mark>Q</mark> A	MKA-			
Rainbow_trout	QLGPAA <mark>EQ</mark> AKEKLI	MALYETIS <mark>QA</mark>	MKA-			
Salmo_salar	RWAPPP <mark>RR</mark> PSKS	SSWLSTRP <mark>SA</mark>	RP			
Danio_rerio	RMEPYM <mark>EN</mark> VRTTFAQMYETIAKAIQA-					
Anguilla_japonica	KLKPYAEELKTKLVALWESLSQPKAS-					
Cyprinus_carpio	KMNELG EE VKPHF1	EAIFAAVQ <mark>KA</mark>	IYKP			
	4	÷				
				S Trutta	B	
			——— T_arco	piris.	-	
	L		_	S_Atlant	ico.	
				– Pez_cebra.		
			•	Ca	rpa.	
L			—— Anguila.			

Figura 10. Análisis comparativo entre las pre-pro-apoA-I de carpa y otros teleósteos.

Panel A. Alineamiento múltiple entre apoA-I de carpa y otros teleósteos. (*) indica residuos idénticos; (:) sustituciones conservativas y (.) sustituciones semiconservativas. **Panel B**. Dendrograma del alineamiento múltiple mostrado en A.

Α

Las propiedades físico-químicas teóricas, deducidas de la secuencia de apoA-I de carpa se encuentran descritas en las Tablas 1 y 2. Entre los distintos valores entregados en la Tabla 1 se destacan para la proteína madura un peso molecular de 27.626 Da y un punto isoeléctrico de 5,9.

La composición aminoacídica de apoA-I de carpa madura es mostrada en la Tabla 2. La frecuencia de residuos dentro de la secuencia muestra que esta proteína esta compuesta en su mayoría por ácido glutámico, lisina, leucina y glutamina los cuales son residuos característicos en favorecer la formación de alfa-hélice. Por otro lado la estructura contiene un bajo porcentaje de residuos desestabilizadores de alfa-hélice, tan solo de un 13 % de los cuales la mayoría corresponden a residuos de prolina. Del total de residuos el 42 % corresponde a residuos hidrofóbicos (A, V, F, P, M, I, L, W, Y), destacándose los residuos de leucina con un 11,5 %.

Con el objeto de realizar una comparación de secuencia entre apoA-I de organismos alejados evolutivamente y definir similitudes y diferencias se realizó un alineamiento de las secuencias maduras de apoA-I de carpa y humano. La imagen se muestra en la Figura 11.

En el alineamiento se muestra la ubicación de las 10 α-hélices definidas para apoA-I de humano según las repeticiones internas de 11 y 22 aminoácidos (Brouillette, C., 2001). Del alineamiento, los porcentajes de identidad y homología obtenidos corresponden tan solo al 19 y 54 % respectivamente. A pesar de la baja homología mostrada entre secuencias, los residuos de prolina que delimitan las

Secuencia nucleotídica (cDNA)					
% G-C	51,47				
N° bases	1323				
Pre-pro-proteína					
N° Residuos	257				
PM teórico (Da)	30.204,9				
Región péptido señal	1 al 18				
Región pro-proteína	19 al 22				
Coeficiente de extinción molar a 280 nm (L/mol/cm)	17.545				
Concentración para 1 DO a 280 nm (g/L)	1,722				
Proteína madura					
N° residuos	235				
PM teórico (Da)	27.626				
pl teórico	5,945				
Coeficiente de extinción molar a 280 nm (L/mol/cm)	17.420				
Concentración para 1 DO a 280 nm (g/L)	1,593				

Tabla 1. Propiedades físico químicas de la secuencia nucleotídica,aminoacídica de la pre-pro-apoA-l y de la proteína madura.

Composición aminoacídica						
	N° de residuos	Frecuencia				
Alanina (A)	14	0,06				
Aspártico (D)	12	0,051				
Glutámico (E)	32	0,136				
Fenilalanina (F)	10	0,043				
Glicina (G)	8	0,034				
Histidina (H)	8	0,034				
Isoleucina (I)	7	0,03				
Lisina (K)	28	0,119				
Leucina (L)	27	0,115				
Metionina (M)	7	0,03				
Asparragina (N)	4	0,017				
Prolina (P)	11	0,047				
Glutamina (Q)	18	0,077				
Arginina (R)	11	0,047				
Serina (S)	8	0,034				
Treonina (T)	8	0,034				
Valina (V)	13	0,055				
Triptófano (W)	1	0,004				
Tirosina (Y)	8	0,034				

Tabla 2. Composición aminoacídica de apoA-I de carpa madura.



Figura 11. Alineamiento de secuencia entre apoA-I de carpa y humana.

Alineamiento de secuencia aminoacídica madura para apoA-I de carpa y humano. (*) indica residuos idénticos; (:) sustituciones conservativas y (.) sustituciones semiconservativas. Además, se destaca la localización de cada una de las α -hélices definidas para la secuencia de humano. Las estrellas indican residuos de prolina conservados.

repeticiones de 11 y 22 aminoácidos, se encuentran en la mayoría de los casos conservadas.

El análisis de predicción de estructura secundaria de apoA-I de carpa y humano, Figura 12, se realizó mediante los métodos Gibrat, Levin, Gor3, Sopma y Predator. Estos arrojaron para cada uno de ellos un elevado contenido α -helicoidal, sobre el 60 %, tanto para carpa como para humano. Este contenido de α -hélice es superior en apoA-I de carpa, alcanzando por el método Sopma, a un 95 % de estructura α helicoidal.

Para analizar las repeticiones de 11 aminoácidos, se realizó un alineamiento entre cada una de ellas, como se muestra en la Figura 13 para carpa y en la Figura 14 para humano. Se clasificó los residuos aminoacídicos en ácidos (D, E), básicos (R, H, K) e hidrofóbicos (A, V, F, M, I, L, W, Y, P). El resto de los residuos se consideraron como indiferentes (Byrnes y col., 1987). El análisis mostrado en la Figura 13, alinea las 17 repeticiones de 11 aminoácidos contenidas en la secuencia de apoA-I de carpa y que en la Figura se encuentran destacadas con amarillo. Según el alineamiento, se analizó la distribución de los residuos a lo largo de la secuencia de cada una de las repeticiones. El resultado dejo en evidencia una tendencia en la distribución de los tipos de residuo en cada posición dentro de las repeticiones. La secuencia resultante del alineamiento corresponde a: Pro – Hidrofóbico – Hidrofóbico – X – Ácido – Hidrofóbico – Básico – X – Básico - Hidrofóbico – Hidrofóbico. X indica no predominancia de algún tipo de residuo en la posición. Se destacan por su alta conservación dentro del alineamiento del alineamiento del alineamiento as columnas 3, 6, 7 y 10.



Figura 12. Análisis de predicción de estructura secundaria para apoA-I de Carpa y Humana.

Predicción de estructura secundaria para apoA-I de carpa y humano. Se evaluaron diversos métodos de predicción incluidos en el programa ANTHEPROT y en http://us.expasy.org/tools/#secondary.

El análisis arrojó un contenido predominantemente α-helicoidal similar para ambas proteínas, sin embargo por todos los métodos este fue superior para carpa.



Figura 13. Alineamiento de las repeticiones de 11 aminoácidos en apoA-I de Carpa.

A. En el análisis se destaca en amarillo la región que corresponde a las 10 α-hélices predichas para apoA-I de humano. Los residuos hidrofóbicos (AVFMILWY) se muestran en azul, prolina en rojo, los básicos (RHK) en verde y los ácidos (DE) en marrón. Los residuos no destacados son considerados indiferentes. **B y C**. Muestran la clase de residuos predominantes en cada posición de las repeticiones de 11 aa que resulta del alineamiento. La estrella indica la repetición más conservada según la secuencia mostrada en C.

La repetición entre los residuos 159 y 169 mostró ser la más conservada, teniendo 10 de 11 residuos coincidentes con la secuencia resultante.

El mismo análisis anterior fue realizado con la secuencia de apoA-I humana, el cual se muestra en la Figura 14. Para apoA-I de humano se obtuvieron 18 repeticiones de 11 aminoácidos. Al igual que para apoA-I de carpa, en humano también se obtuvo un patrón común en el alineamiento de las repeticiones de 11 aminoácidos, sin embargo la secuencia resultante en este análisis resultó ser muy similar aunque no idéntica a la obtenida con apoA-I de carpa. La secuencia corresponde a Pro – Hidrofóbico – Hidrofóbico – Ácido – Ácido – Hidrofóbico – Básico – Ácido – Básico - Hidrofóbico –X.

Se destacan las columnas 3, 6 y 10 por encontrarse altamente conservadas. Las columnas 6 y 10 poseen un 94 % de conservación para residuos hidrofóbicos.

La repetición entre los residuos 143 y 153 mostró ser la más conservada, conteniendo 10 de 11 residuos coincidentes con la secuencia resultante.

Para ambos análisis se destacan los residuos de prolina los cuales se encuentran delimitando las repeticiones de 11 o 22 aminoácidos en la columna 1.

De las secuencias obtenidas en los análisis realizados anteriormente, los cuales son mostrados en las Figuras 13 y 14, se obtuvo una secuencia consenso la cual corresponde a Pro – Hidrofóbico – Hidrofóbico – Ácido – Ácido – Hidrofóbico – Básico – Ácido – Básico - Hidrofóbico – Hidrofóbico. Para obtener esta secuencia, los residuos designados como "X" en las secuencias obtenidas individualmente para carpa y humano, fueron reemplazados por el residuo con mayor frecuencia en la posición.



Figura 14. Alineamiento de las repeticiones de 11 aminoácidos en apoA-I humana.

A. En el análisis se destaca en amarillo la región que corresponde a las 10 α-hélices predichas para apoA-I de humano. Los residuos hidrofóbicos (AVFMILWY) se muestran en azul, prolina en rojo, los básicos (RHK) en verde y los ácidos (DE) en marrón. Los residuos no destacados son considerados indiferentes. **B y C**. Muestran los tipos de residuos predominantes en cada posición de las repeticiones de 11 aa que resultan del alineamiento. La estrella indica la repetición mas conservada según la secuencia mostrada en C.

Con la secuencia consenso obtenida, se realizó un análisis de "helical wheel". Esta corresponde a una representación de la disposición de los residuos formando una α -hélice con 3,6 residuos por vuelta, Figura 15. El panel superior muestra la distribución de los 11 residuos que componen la secuencia consenso, formando una α -hélice. El panel inferior muestra el mismo análisis, pero con una secuencia de 22 residuos formada por 2 repeticiones en tandem de la secuencia utilizada en el análisis del panel superior. El resultado del análisis muestra la tendencia de los residuos hidrofóbicos a distribuirse a un lado de la hélice, mientras que los residuos básicos se encuentran dispuestos en la interfase polar-apolar y los residuos ácidos al centro de la fase polar.

4.3 Predicción de la estructura terciaria de apoA-l de carpa.

Los análisis de predicción de estructura terciaria de apoA-I de carpa se realizaron mediante modelamiento por homología utilizando la estructura cristalina de Δ (1-43) apoA-I humana, Figura 16. Este análisis resultó en una estructura tridimensional en forma de herradura formada por los residuos contenidos entre Fen59 y Pro235. "Swiss Model", para modelar, seleccionó una región de 177 residuos de apoA-I de carpa y los alineó con una región de apoA-I humana entre los residuos 43 y 219, obteniendo un porcentaje de identidad del 26.1 %. En el panel A se observa la estructura obtenida en disposición de "space fill", donde es destacada claramente la región hidrofóbica en azul en el interior de la herradura. Los residuos básicos, en verde, se disponen inmediatamente contiguos a los residuos hidrofóbicos en la interfase polar-apolar y los residuos ácidos se disponen en el centro de la fase polar, lo cual es característico de las α -hélices anfipáticas de tipo A. En el panel B, se muestra la estructura α -helicoidal





En la representación se pueden observar la disposición de cada residuo formando una α-hélice. En azul se muestran los residuos hidrofílicos y en rojo los hidrofóbicos. La secuencia se muestra en la parte superior de cada recuadro y corresponde en el panel superior a la secuencia obtenida de los análisis de las Figuras 13 y 14. En el panel inferior, la secuencia corresponde a 22 residuos aminoacídicos formada por dos repeticiones en tandem de 11. "L", representa residuos hidrofóbicos, "D", ácidos y "K", básicos.


Figura 16. Modelamiento mediante homología para apoA-I de carpa.

Panel A, muestra la estructura en disposición "spacefill". Se destacan los residuos hidrofóbicos en azul (A, V, F, P, M, I, L, W, Y), los básicos en verde (R, H, K) y los ácidos en rojo (D, E). **Panel B**, muestra la estructura α-helicoidal, además de los residuos de prolina en rojo los cuales quiebran las hélices resultando la forma de herradura de esta proteína.

de apoA-I de carpa, donde los residuos de prolina, mostrados en rojo, moldean la estructura en forma de herradura.

4.4 Análisis fúncional de apoA-I.

4.4.1 Purificación de HDL y apoA-I de carpa y humano.

La purificación de HDL de carpa y humano se realizó de acuerdo a lo descrito por Amthauer y col., (1988; 1989). Este método, muy similar tanto para la purificación de HDL de carpa como para humano, utiliza cromatografía de afinidad en Cibacron Blueagarosa.

En la Figura 17 (inserto), se muestra el perfil electroforético en PAGE-SDS 12 % de la HDL así aislada. En el carril 1, se muestra las bandas correspondientes a sus dos apolipoproteínas, apoA-I y apoA-II. Este resultado demuestra que del plasma de ambos organismos se logra aislar selectivamente HDL con un alto grado de pureza.

Para la purificación de apoA-I, se fraccionó la HDL deslipidada en una columna de Sephacryl S-200 utilizando condiciones denaturantes. En la Figura 17, se muestra el perfil de elusión correspondiente a la purificación de apoA-I, tanto de carpa como de humano. En el perfil se pueden apreciar 3 picos, que de acuerdo a análisis previos, el primero corresponde a agregados de apolipoproteínas, el segundo corresponde a apoA-I y el tercero a apoA-II. La pureza alcanzada durante la purificación se evaluó mediante el PAGE-SDS 12 % mostrado en el inserto. La apoA-I purificada, (pico 2) carril 2, migra con un peso molecular aproximado de 27,5 kDa. La apoA-I así aislada muestra un alto grado de pureza.



Figura 17. Purificación de apoA-I de carpa y humana

El resultado es representativo del perfil de elusión obtenida tanto para HDL de carpa como para humano mediante cromatografía de filtración en gel en Sephacryl S-200. Se cargó HDL deslipidada y se eluyó según lo descrito en materiales y métodos. **Pico 1**, corresponde a agregados de apolipoproteínas. **Pico 2**, corresponde a apoA-I. **Pico 3**, apoA-II. **Inserto**, PAGE-SDS al 12 %, muestra los componentes proteicos para cada paso de purificación. Se muestra, plasma de carpa. Carril 1, HDL cargada a la columna. Carriles 2 y 3, picos 2 y 3 del perfil y que corresponden a apoA-I y apoA-II respectivamente.

4.4.2 Ensayo de solubilización de vesículas multilaminares de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC).

Con el objetivo de evaluar y comparar la capacidad de apoA-I de carpa y humano para interactuar con lípidos se montó un ensayo según lo descrito por Pownall y col 1978. El resultado del ensayo de solubilización de vesículas de DMPC es mostrado en la Figura 18.

En el gráfico se puede apreciar el aclaramiento de la suspensión de vesículas el cual fue medido a 325 nm y a 24°C. El resultado obtenido en el tiempo, mostró para humano una curva de disminución de la turbidez inicial tendiendo al equilibrio a los 2000 segundos con un aclaramiento final del 70 % en relación a la turbidez inicial. En cambio para carpa, la curva de disminución de la turbidez fue más acentuada llegando a un aclaramiento al final del ensayo de un 20 % de la turbidez inicial. El control negativo se mostró inalterable durante el periodo del ensayo.

Por lo tanto, apoA-I de carpa muestra una mayor eficiencia en la interacción con lípidos que su contraparte de humano, siendo esta diferencia de un 60 %.

4.4.3 Análisis comparativo de la solubilización por apoA-I de carpa intacta o truncada en el extremo carboxilo a vesículas multilaminares de DMPC.

El mismo ensayo anterior se utilizó para evaluar y comparar la capacidad de solubilizar las vesículas de DMPC para apoA-I de carpa intacta y truncada en su carboxilo terminal (Figura 19). ApoA-I de carpa fue truncada en el carboxilo terminal mediante un ensayo de proteólisis limitada con quimotripsina, según lo descrito por





Utilizando una relación molar lípido:proteína de 5:1 y una concentración de proteína de 0,1 mg/ml se evaluó la capacidad de ambas apoA-I para solubilizar las vesículas de DMPC en el tiempo midiendo a 325 nm y a 24°C. Círculos negros apoA-I de carpa. Círculos abiertos apoA-I de humano. Triangulo control negativo.





Panel A. Se truncó apoA-I de carpa en su carboxilo terminal mediante proteólisis limitada con quimotripsina y se evaluó su capacidad de solubilizar las vesículas de DMPC a 24°C. Círculos negros, apoA-I de carpa intacta. Círculos abiertos, apoA-I de carpa truncada. Triángulos, control negativo.

Panel B, electroforesis PAGE-SDS al 12% de plasma de carpa, apoA-I de carpa intacta y apoA-I de carpa truncada en el extremo carboxilo terminal.

Ji y Jonas, (1995) y montado para apoA-I de carpa por Concha y col., (2004). El corte específico en el C-terminal de apoA-I de carpa fue chequeado mediante Western blot, donde un anticuerpo dirigido al carboxilo terminal de apoA-I, resultó en una inmunoreactividad negativa para la proteína truncada (Concha y col., 2004). El ensayo de la Figura 19, muestra en el panel B una electroforesis PAGE-SDS de apoA-I de carpa intacta y truncada en el C-terminal. El gel muestra claramente la diferencia de tamaño entre la proteína intacta y la truncada, siendo esta última más pequeña. El ensayo de solubilización mostrado en el panel A, resultó para la proteína truncada una curva de disminución de la turbidez menos acentuada que la curva para la proteína intacta, resultando al final del ensayo una disminución de la turbidez cercana al 60 % en relación a la turbidez inicial. El control negativo se mostró inalterable durante el periodo del ensayo.

Por lo tanto, el resultado del ensayo muestra que apoA-I de carpa truncada es un 47 % menos eficiente que la proteína intacta en solubilizar las vesículas de fosfolípidos.

4.4.4 Análisis de la interacción de apoA-l y HDL de carpa con membranas de eucariontes.

Con el objetivo de evaluar la interacción de HDL y apoA-I de carpa con membranas celulares de eucariontes, se realizó un ensayo utilizando la línea celular BHK-21 (Baby Hamster Kidney), la cual posee la particularidad de no presentar en la superficie de su membrana ninguno de los receptores más conocidos por interactuar con HDL y/o apoA-I, tales como SR-B1 y ABCA-1 (Brundert y col, 2003 y Oram y col,



Figura 20. Análisis de la interacción de apoA-I y HDL de carpa con membranas de eucariontes.

Estudio de la interacción de apoA-I y HDL de carpa con células BHK-21. Las células fueron incubadas con la proteína a una concentración de 0,2 mg/ml por 20 min a 4°C. La inmunodetección se realizó utilizando un antisuero anti-apoA-I de carpa hecho en conejo y un segundo anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a Alexa-fluor 488. Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía confocal usando objetivo 40x y una sección óptica a 4,5 y 3,0 µm respectivamente.

2001). El análisis mostrado en la Figura 20, sugiere la unión de apoA-I y HDL a la membrana de estas células sin la mediación de los receptores nombrados anteriormente. Esta unión soportaría los sucesivos lavados con tampón fosfato salino.

4.4.4.1 Unión de apoA-I de carpa a membranas de células BHK-21

Para corroborar la unión de apoA-I de carpa a la membrana plasmática de esta línea celular, se obtuvo mediante fraccionamiento celular el extracto crudo de esta fracción desde células sin incubar con apoA-I (control negativo) y post-incubación con apoA-I en condiciones similares al ensayo mostrado anteriormente. La fracción correspondiente a membrana plasmática fue sometida a un análisis de Western blot, el cual se muestra en la Figura 21. El resultado del análisis fue la inmunodetección de apoA-I en el extracto de membrana plasmática de las células incubadas con apoA-I. La posible inmuno-reactividad cruzada con algún componente de la línea celular es descartada con el control negativo.

4.4.4.2 Estudio de interacción de apoA-I y HDL de carpa con espermatozoides eyaculados de bovino

Las evidencias de que apoA-I estaría participando tanto en la capacitación como en la activación de los espermatozoides (Akerlof y col, 1991, Therien y col, 1997) nos llevó a evaluar la unión tanto de HDL como de apoA-I de carpa a estas células. La Figura 22 muestra una inmunocitoquímica realizada en espermatozoides de bovino eyaculados con y sin tratar con HDL o apoA-I, resultando esto en una inmunoreactividad positiva para ambas moléculas en los espermatozoides tratados. Tal



Figura 21. Unión de apoA-l de carpa a membranas de células BHK-21.

Luego de incubar las células BHK-21 con apoA-I, se preparó un extracto crudo de membrana plasmática. Las proteínas de membrana se separaron por PAGE-SDS y la apoA-I de carpa unida a la membrana se inmunodetectó mediante Western blot.

unión como en el caso anterior de la línea celular, soportaría sucesivos lavados con tampón fosfato salino.



Figura 22. Estudio de la interacción de apoA-I y HDL de carpa con espermatozoides eyaculados de bovino.

Los espermatozoides fueron incubados con apoA-I a una concentración de 17 µg/ml por 20 min a 20°C. La inmunodetección se realizó utilizando un anti-suero anti-apoA-I de carpa hecho en conejo y un segundo anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina. Las imágenes fueron obtenidas con objetivo 100x.

5. DISCUSIÓN.

Los mecanismos y aspectos estructurales involucrados en la funcionalidad de apoA-I se encuentran bajo constantes estudios. Esto principalmente por su indudable contribución como proteína anti-aterogénica y su rol protector frente a otras enfermedades cuya etiología esta relacionada de una u otra forma con el transporte de lípidos y colesterol. En nuestro laboratorio nos propusimos evaluar aspectos estructurales y funcionales de dos apoA-I alejadas evolutivamente, este es el caso de apoA-I de carpa y humano. La apoA-I de humano es la más estudiada de todas las apoA-I debido a su gran impacto en la salud humana. ApoA-I de carpa en cambio, ha sido muy poco estudiada.

El hecho de que humanos y peces teleósteos hayan divergido hace cientos de millones de años, nos permitirá contar con información para comenzar a definir aspectos estructurales relevantes (más conservados) y no tan relevantes para la funcionalidad a esta proteína.

Como primer paso, la obtención de la secuencia aminoacídica completa de apo A-I de carpa nos permitió definir similitudes y diferencias generales en aspectos estructurales y funcionales entre distintas apolipoproteínas A-I.

El gran número de transcritos de apoA-I que normalmente son expresados en el hígado de carpa (aproximadamente 10 % del total de tránscritos), órgano del cual se construyo la biblioteca de cDNA y el poseer un clon conteniendo dos tercios de la secuencia aminoacídica de apoA-I de carpa, fueron factores críticos para la obtención de la secuencia completa. La estrategia para diseñar la sonda de una hebra fue elaborada inicialmente para aislar específicamente clones que contuviesen la región 5' no presente en el clon parcial de apoA-I de carpa (Figura 3). Sin embargo esta sonda, no detectó ufp positivas en un rastreo primario, lo que si se logró utilizando el inserto del clon parcial de apoA-I. Los fagos recombinantes se continuaron purificando en un rastreo secundario. Mediante análisis de Southern blot, se logró determinar que esta última sonda, hibridaba parcial e inespecíficamente con una región del vector no correspondiente al inserto, esta hibridación inespecífica no fue posible de eliminar completamente después de lavados consecutivos a máxima estrictez. Como consecuencia de esto, en el rastreo realizado con esta sonda una fracción de las ufp seleccionadas no corresponderían a clones conteniendo la secuencia de apoA-I.

Del análisis de Southern blot que se muestra en la Figura 7, la sonda una hebra hibridó específicamente con el DNA del vector más inserto linearizado, con el inserto liberado por las enzimas de restricción y con los productos de PCR utilizando partidores específicos para amplificar el sitio de múltiple clonamiento tanto para el clon parcial de apoA-I de carpa como para el clon C-1a obtenido. Sin embargo, esta sonda también detectó un producto de amplificación no esperado. Esta banda muestra un tamaño de producto de amplificación intermedio entre el clon C-1a y el clon parcial, de aproximadamente 1,1 kpb. Esta banda no fue detectada al analizar los productos de amplificación en el gel de agarosa con EtBr, sugiriendo una menor eficiencia de amplificación de este producto intermedio. Al analizar el origen de esta inesperada banda se pudo determinar que uno de los partidores utilizados para amplificar el sitio de múltiple clonamiento del vector p-Bluescript, correspondiente al T7, se apareaba parcialmente con una región interna del inserto, resultando en un tamaño de amplificación coincidente con el tamaño de la banda encontrada en el Southern blot, de 1,1 kpb.

Con respecto al resultado de la secuenciación del clon C1a, este mostró un total de 1323 bp, de los cuales 202 bp corresponderían a la región 5' no codificante, 774 bp a la región codificante y 347 bp a la región 3' no codificante (Figura 8). La región 3' no codificante muestra un alto contenido de nucleótidos de adenina lo que es coincidente con el tallo de poli-adenina característico para esta región en este tipo de transcritos. La comparación de secuencia nucleotídica de este clon con el clon parcial de apoA-I de carpa obtenido previamente en nuestro laboratorio mostró un muy alto porcentaje de identidad entre secuencias. Sin embargo y luego de múltiples secuenciaciones utilizando distintos partidores, fue imposible esclarecer ciertas ambigüedades en algunos nucleótidos agrupados en el extremo 5' del clon conteniendo la secuencia completa. Dado el bajo número de nucleótidos sin esclarecer y que la mayoría no involucró sustitución aminoacídica se consideró que esto no era impedimento para la realización de los análisis a la secuencia aminoacídica obtenida en esta tesis.

La secuencia aminoacídica deducida de apoA-I de carpa esta compuesta por 257 residuos, siendo esta apoA-I la de menor número de residuos encontrada en bases de datos públicas. Entre las distintas secuencias depositadas encontramos las secuencias de *S. trutta* con 262 residuos y *H. sapiens* con 267 residuos entre otras.

Por análisis predictivos se dedujo que ApoA-I de carpa contiene en su extremo amino 18 residuos correspondientes al péptido de señal, 4 a un segmento pro-péptido y 235 residuos a la proteína madura (Figura 8). La secuencia del péptido de señal de apoA-I de carpa seguiría los cánones descritos para este tipo de secuencias en otras proteínas de exportación celular, tanto en el número de residuos, como en el alto contenido de residuos hidrofóbicos (Deviller-Thiery y col., 1975; Blobel y col., 1975 y von Heijne, 1983). Cabe destacar que los residuos de glutamina y alanina que preceden el corte del péptido de señal son muy conservados en las distintas apoA-I conocidas, como es posible visualizar en el alineamiento múltiple de la Figura 10 (residuos 18 y 19). Además, estudios realizados por Nielsen (1997), muestran la existencia de un residuo de alanina muy conservado adyacente al sitio de corte tanto en proteínas procariontes como eucariontes con este tipo de péptido señal (alanina 19 en nuestra pre-pro-proteína). Estos antecedentes validan nuestra predicción para el sitio de corte del pre-péptido en nuestra proteína.

En el caso del pro-péptido de apoA-I de carpa, el antecedente publicado por De Smet y col (1998), quien secuenció el extremo amino de la apoA-I de carpa madura, nos proporcionó la información necesaria para confirmar nuestras sospechas del sitio de corte del pro-péptido en nuestra proteína, ya que la secuencia obtenida por estos investigadores en esta región es 100 % coincidente con la obtenida por nosotros.

Los antecedentes publicados por Law y Brewer (1984), demostraron que este pro-péptido estaría siendo procesado extracelularmente en el plasma. Ellos lograron aislar la pro-apoA-I desde el conducto linfático torácico en humanos después de una dieta rica en grasas y posteriormente secuenciaron su amino terminal, encontrando que en humanos esta apoA-I contaba con 6 residuos adicionales que la apoA-I madura mayoritaria en el plasma. Los análisis realizados mediante cladograma predicen lo esperado. En la Figura 9, donde es analizado un grupo de proteínas provenientes de organismos altamente divergentes evolutivamente, apoA-I de carpa tiende a agrupar con salmón y a divergir del resto de las especies. En la Figura 10B, se analizó un grupo de organismo más cercanos evolutivamente como lo son los teleósteos. En este análisis apoA-I de carpa tiende a divergir del resto de las especies más cercanas entre si, como lo son los salmónidos. Esta concordancia obtenida en los análisis de cladograma, respaldan la veracidad de la secuencia obtenida.

Con relación al análisis de alineamiento múltiple entre las secuencias de pre-proapoA-I de peces teleósteos, a nivel global este muestra una baja homología, de tan solo el 54 %. Sin embargo, a nivel local la homología entre secuencias se ve fortalecida hacia el tercio N-terminal y disminuida en los dos tercios del C-terminal, observándose para esta región una mayor cantidad de sustituciones conservativas, antecedente ya publicado por Frank y Marcel (2000) para otras apoA-I.

Al realizar la comparación de secuencia entre apoA-I de humano y carpa (Figura 11), se puede observar que a pesar de la baja homología entre ambas secuencias se pueden encontrar conservadas ciertas características como las repeticiones de 11 y 22 residuos aminoacídicos flanqueados por residuos de prolina. Estas repeticiones dan origen a 10 hélices en la secuencia de humano, las cuales pueden ser extrapoladas a la secuencia de carpa mediante el alineamiento de secuencia.

Paradójicamente el extremo C-terminal es poco conservado a nivel de secuencia aminoacídica a pesar de que ha sido ampliamente reconocido como un dominio muy importante en la interacción con lípidos. Ello sugiere que la importancia de esta región no se encuentre en la disposición secuencial de los residuos aminoacídicos, sino que seria más importante la flexibilidad estructural y la disposición de los distintos residuos dentro de la estructura secundaria de la proteína (Frank y Marcel, 2000).

Por otra parte, los residuos de prolina contenidos en las distintas apoA-I, altamente conservados, han sido postulados como componente importante en aspectos estructurales de las apoA-I (Borhani y col., 1997). Brouillette y col., (2001), mencionan que estos residuos de prolina estarían moldeando la estructura primaria de la proteína resultando finalmente en una estructura en forma de herradura, que sumada a la estructura α -helicoidal constituirían una estructura ideal para la unión de lípidos.

Anteriormente fue mencionado que a nivel de estructura primaria apoA-I se encuentra formada por repeticiones de 11 y 22 aminoácidos. La mayoría de ellas delimitadas por residuos de prolina. Esta característica se encuentra conservada, en menor o mayor grado, en todas las apoA-I conocidas. Un análisis más profundo de estas repeticiones en apoA-I de carpa reveló la existencia de un patrón de secuencia conservado observado en distintas apoA-I (Figuras 13 y 14), como en el caso de humano y pollo (Rajavashisth y col., 1987). Este patrón consistente en una distribución particular de los distintos tipos de residuos aminoacídicos dentro de cada una de las repeticiones de 11 aminoácidos se encuentra conservada en gran parte de la proteína. Para carpa, el patrón de secuencia fue obtenido a partir del análisis mostrado en la Figura 13. Esta secuencia conservada corresponde a: Pro – Hidrofóbico – Hidrofóbico – X – Ácido – Hidrofóbico – Básico – X – Básico - Hidrofóbico – Hidrofóbico, el cual resulta en un patrón de secuencia muy similar al obtenido para apoA-I de otras especies, como en el caso de pollo y humano. La importancia de este patrón de

secuencia se deduce del hecho de que dos especies muy alejadas evolutivamente como lo son humano y pollo, conservan un patrón de secuencia idéntico (Rajavashisth y col., 1987) el cual corresponde a: Pro – Hidrofóbico – Hidrofóbico – Ácido – Ácido – Ácido – Básico – Ácido – Básico - Acido – Básico - Hidrofóbico – X, y que carpa, como especie aún más alejada evolutivamente posee un patrón de secuencia muy similar. El análisis posterior, mostrado en la Figura 15, afirma aún más la importancia de este patrón de secuencia, ya que el análisis de "Helical Wheel" muestra que los residuos que componen este patrón de secuencia tienden a la formación de una α -hélice anfipática, motivo estructural ampliamente aceptado por tener una alta afinidad por lípidos y que es la estructura predominante en todas las apoA-l estudiadas. Por otro lado, los distintos grados de conservación de las repeticiones de 11 aminoácidos con respecto al patrón de secuencia conservada, podrían ser el resultado de sustituciones aminoacídicas que estarían otorgando a esta proteína su reconocida multifuncionalidad que no tan solo involucra la interacción con lípidos.

La importancia de la conservación del patrón de secuencia en la interacción con lípidos se evidencia por análisis de deleciones realizados por Frank y col., (1997). El grupo de este investigador realizó una deleción en la región comprendida entre las hélices 5 y 7 de apoA-l humana resultando esto en una clara disminución de la interacción de esta proteína mutante con vesículas de DMPC. Los análisis mostrados en las Figuras 13 y 14 indican que las repeticiones internas de apoA-l de carpa entre los residuos 126 y 169 (hélices 5 a 7), muestran ser las más conservadas en relación al patrón de secuencia conservado y que en humano estas corresponden a los residuos 142 y 175 (hélices 6 y 7). Este hecho, donde la deleción de regiones muy conservadas

con respecto al patrón de secuencia conservado provocan una disminución en la solubilización de vesículas de DMPC y que comparativamente deleciones de otras α-hélices no provoquen el mismo efecto (Frank y col., 1997) nos demuestra una clara participación de estas hélice anfipáticas en la interacción con lípidos y más aún, la participación en tal interacción se vería favorecida al poseer una mayor similitud a la secuencia patrón conservada de 11 aminoácidos. Según esto, la región 126-169 en apoA-I de carpa, la cual incluye 2 repeticiones de 11 aminoácidos muy conservadas respecto a la secuencia consenso y que además están delimitadas por residuos de prolina, es una región de alto interés para ser estudiada (ver Figuras 13 y 16, panel B).

Por otro lado, múltiples estudios han demostrado que las α-hélices del C-terminal de apoA-I de humano tendrían una alta afinidad por lípidos y además estarían involucradas en la interacción inicial con lípidos. Este comportamiento es concordante con la alta similitud que posee esta región de apoA-I de humano (209-241) con la secuencia consenso de las repeticiones de 11 aminoácidos, sin embargo esta característica no está presente en el C-terminal de apoA-I de carpa, donde la similitud de la secuencia consenso de las repeticiones de 11 aminoácidos en esta región es muy baja.

Wang y col., (2005), postulan que no todas las α -hélices de apoA-I de humano serian de clase A, sino que la región entre los residuos 8-33 correspondería a una α hélice de clase G (globular), entre 88-120 y entre los residuos 209-241 de clase Y (con una distribución de carga específica). Este carboxilo terminal tendría por lo tanto una distribución de carga que seria importante en la interacción con lípidos. Por el contrario, en el caso del C-terminal de apoA-I de carpa éste estaría compuesto por una gran cantidad de residuos hidrofóbicos acompañados por solo algunos residuos cargados.

Experimentos realizados por Wang y col., (2005), midiendo presiones de exclusión en interfases agua/treolina con apoA-I y con un péptido sintético formado por dos repeticiones en tandem de 22 aminoácidos derivados de la secuencia consenso de las repeticiones en tandem de apoA-I, apoA-IV y apo-E, la cual es muy similar a la obtenida en esta tesis, resultó en presiones de exclusión para el péptido sintético muy similares a las obtenidas para apoA-I, lo que confirmaría la importancia de este tipo de secuencia en otorgar gran afinidad por lípidos a apoA-I.

Los alineamientos múltiples estándar con Clustal W realizados entre teleósteos y entre carpa y humano muestran una baja identidad y homología. Este hecho no concuerda con los antecedentes encontrados en el alineamiento entre las distintas repeticiones de 11 aminoácidos donde se obtuvo un patrón muy similar tanto para carpa como para humano, la cual se encuentra representada con distintos grados de conservación en cada una de las repeticiones, esto pese a corresponder a organismos alejados evolutivamente. Estos antecedentes nos llevan a concluir que alineamientos estándares entre distintas proteínas ayudan a establecer similitudes a nivel general, pero que análisis tales como predicción de estructura secundaria o como el alineamiento entre las repeticiones de 11 aminoácidos, donde los residuos son agrupados según su participación en estructuras secundarias muestran la real similitud a nivel estructura-función que existe en este grupo de proteínas ortólogas (Thompson y col., 1994; Cornette y col., 1987; Byrnes y col., 1987; Rajavashisth y col., 1987). A nivel de estructura secundaria, la secuencia de apoA-I de carpa conserva la mayoría de las características encontradas hasta ahora en las apoA-I, entre las cuales se destacan un elevado contenido α-helicoidal de características anfipáticas de clase A, donde los residuos hidrofóbicos se encuentran a un lado de la hélice mientras que los residuos básicos están en la interfase polar-apolar y los residuos ácidos se encuentran al centro de la fase polar y se encuentran flanqueadas por residuos de prolina.

El resultado de la predicción de estructura secundaria resulta en un mayor contenido de estructura α-helicoidal para carpa que para humano, esta característica podría ser relevante en el comportamiento global de esta proteína.

La estructura terciaria de apoA-I de carpa obtenida mediante modelamiento por homología a partir de apoA-I humana utilizando "SwissModel" y optimizada con el software "deepview", resultó en un modelo que concuerda con los antecedentes mostrados anteriormente. A nivel de estructura secundaria es posible visualizar una estructura predominantemente α -helicoidal de características anfipáticas y en la mayoría de los casos de clase A, siempre más conservado en las hélices centrales. Otro antecedente que respalda una aproximación real a la estructura terciaria de apoA-I de carpa son los residuos de prolina mostrados en el panel B de la Figura 16, los cuales en su mayoría son residuos conservados en la secuencia de apoA-I de humano y que estarían cumpliendo la función particular de moldear la estructura α -helicoidal para dar finalmente la forma global a la estructura con forma de herradura, estos datos son coincidentes con la estructura cristalina de apoA-I Δ (1-43) de humano libre de lípidos (Borhani y col., 1997).

Por último, se destacan en la estructura de apoA-I de carpa un dominio amino terminal conservado con el resto de las apoA-I, al igual que dominios centrales los cuales conservan la cualidad de estar formado por repeticiones de 11 y 22 aminoácidos flaqueadas por residuos de prolina con un largo dominio hidrofóbico de unión a lípidos, sin embargo el C-terminal se encuentra muy poco conservado e influenciado por 2 deleciones (Figuras 10 y 11). Brouillette y col., (2001), comentan en una revisión, que estas deleciones podrían provocar cambios drásticos tanto en la estructura como en la funcionalidad de apoA-I, como es el caso de apoA-I de ratón, donde a pesar de poseer una alta homología entre secuencias con apoA-I de humano, simples deleciones en apoA-I de ratón en los residuos Gly186 y Ala187, al comparar con apoA-I humana, desencadenan grandes cambios en la funcionalidad de esta proteína, llegando incluso a perder sus propiedades anti-aterogénicas. Este drástico cambio no seria tan solo responsabilidad funcional de estos residuos en particular, sino que, la interrupción de las repeticiones de 11 y 22 aminoácidos provocaría un cambio en la orientación de la superficie apolar de hasta 100º quedando ésta más expuesta a la fase acuosa. La exposición de los residuos hidrofóbicos a la fase acuosa podría resultar en un efecto global en la estructura de la proteína afectando por consiguiente, su funcionalidad. En el caso de apoA-I de carpa, esta deleción se encuentra presente en el extremo amino de la hélice 9 (apoA-I de carpa también posee otras deleciones en el N-terminal, Figura 10 y 11). Esta deleción en 2 residuos en el C-terminal de Lys202 en la proteína madura (Figura 11), también observado en apoA-I de anguila (Figura 10), produciría la inversión de la hélice en esta región y con esto la inversión de la fase apolar (ver Lys202 Figura 16). Sumado al efecto provocado por la deleción de 2 residuos en la estructura de apoA-I de carpa, ésta posee un C-terminal, comparativamente con otras apoA-I, altamente hidrofóbico y además pocos residuos cargados. Esto resultaría en una hélice apolar más grande y más expuesta a la fase polar lo que incrementaría el costo energético para mantener una estructura estable libre de lípidos. Esto último conlleva a una búsqueda permanente de estados de energía menores y por tanto más estables, lo cual se alcanzaría en este caso al esconder los dominios hidrofóbicos de la fase acuosa y exponer los dominios hidrofílicos a la fase acuosa. Esto es coincidente con análisis de perfil de hidrofobicidad realizados (dato no mostrado) los cuales indican un C-terminal para apoA-I de carpa altamente hidrofóbico.

Para realizar estudios funcionales comparativos entre estas 2 apoA-I de especies alejadas evolutivamente, fue necesario purificar HDL y apoA-I de carpa y humano. La primera molécula fue purificada mediante cromatografía de afinidad utilizando una columna de Cibacron-blue agarosa (Amthauer y col., 1988). Con esta técnica se logró aislar HDL de humano con el mismo grado de pureza que para carpa, pero con concentraciones varias veces más bajas para HDL de humano. Esto debido a que en la carpa el componente proteico mayoritario en el plasma corresponde a apoA-I (40 % de proteínas totales en el plasma) alcanzando concentraciones de 1 a 2 g/dl, en cambio en humano el componente proteico mayoritario del plasma es la albúmina con 3,6 a 5,2 g/dl. Debido a esto, en la purificación de HDL de humano fue necesario eluir selectivamente la albúmina antes de obtener HDL pura.

ApoA-I de carpa y humano se purificaron mediante cromatografía de filtración en gel después de una etapa de deslipidación de la partícula de HDL. Tanto para apoA-I de carpa como para humano se obtuvo el perfil de elusión esperado. Como se muestra en

la Figura 17, se observan 3 picos, el primero corresponde a agregados de apolipoproteínas, el segundo a apoA-I purificada y el tercero a apoA-II, esto es concordante con lo ya descrito por Amthauer, (1990), quien demostró que al igual que para otras HDL descritas, HDL de carpa posee como principales componentes proteicos a apoA-I y apoA-II. Además, el peso molecular obtenido experimentalmente para apoA-I de carpa es consistente con el obtenido de la secuencia aminoacídica deducida la cual corresponde a 27,6 kDa.

Una vez obtenida apoA-I de carpa y humano, se realizaron ensayos funcionales para evaluar la interacción de apoA-I libre de lípidos con vesículas artificiales de fosfolípidos y con membranas de células eucariontes.

Los ensayos realizados con vesículas de DMPC, evaluaron la eficiencia de apoA-I para solubilizar vesículas de fosfolípido en medio acuoso a 24ºC. Esta temperatura corresponde a la temperatura de transición para este tipo de fosfolípido y por lo tanto la temperatura ideal para los estudios de interacción, como fue descrito por Pownall y col., (1979).

Los ensayos de solubilización de vesículas de DMPC muestran que apoA-I de carpa es 60 % más eficiente en su interacción con estas vesículas que apoA-I de humano. La información obtenida del análisis estructural de apoA-I de carpa muestran un contenido α-helicoidal global mayor para carpa que para humano, sin embargo el hecho de que las repeticiones de 11 y 22 aminoácidos no sean tan conservadas en carpa y que en su extremo C-terminal posea un mayor contenido de residuos hidrofóbicos rompiendo la simetría de una estructura predominantemente α-helicoidal anfipática como lo es apoA-I de humano, hacen pensar que la estructura de apoA-I de

carpa libre en lípidos sea más inestable. Esta inestabilidad conformacional del Cterminal llevaría a la estructura a buscar estados más estables, logrando esto al interaccionar con lípidos y ocultar de esta forma los residuos hidrofóbicos. Un mecanismo similar ha sido propuesto por Saito y col., (2003), quien postula para apoA-I humana libre de lípidos una conformación estructural más estable en el extremo Nterminal que en el extremo C-terminal. Según esto proponen un mecanismo de 2 pasos para la interacción de apoA-I humana con lípidos, el cual consiste en definir a apoA-I como una estructura formada por 2 dominios donde el N-terminal esta formado por un abultamiento helicoidal, mientras el dominio C-terminal forma una estructura separada menos organizada, hecho corroborado recientemente con la nueva estructura cristalina de apoA-I libre de lípidos (Ajees y col., 2006). La unión inicial con lípidos ocurriría a través de las hélices anfipáticas del dominio C-terminal, secuencialmente el dominio Nterminal experimentaría una abertura conformacional convirtiendo las interacciones hidrofóbicas hélice-hélice en interacciones hélice-lípidos. Este mecanismo de unión a lípidos podría ser extrapolado a apoA-I de carpa, ya que los requerimientos conformacionales con los cuales consta apoA-I de humano están presentes en carpa, como lo son un elevado contenido α-helicoidal, un dominio amino teminal más conservado conteniendo α-hélices anfipáticas y un dominio C-terminal no tan definido conformacionalmente. En este último punto el C-terminal de apoA-I de carpa tendría un dominio hidrofóbico más grande y menos organizado, esto llevaría a apoA-l de carpa a presentar una mayor afinidad por los lípidos en el paso de unión inicial, explicando de esta forma su mayor eficiencia en solubilizar vesículas de DMPC (Figura 18).

Para demostrar inequívocamente la importancia del extremo C-terminal, se realizaron experimentos con apoA-I de carpa truncada. Esta proteína mostró ser 43 % menos eficiente en la interacción con las vesículas artificiales de DMPC que la proteína intacta. Esta experiencia ha sido realizada utilizando apoA-I de humano (Δ-190-243) mostrando a esta proteína mutante una mayor estabilidad y menos capacidad para solubilizar las vesículas de DMPC (Saito y col., 2003). Análisis realizados por Laccotripe y col., (1997), al cambiar 3 residuos cargados del C-terminal por residuos hidrofóbicos muestran propiedades similares para solubilizar vesículas de DMPC que la apoA-I nativa, este antecedente indica que probablemente no bastaría con el incremento en residuos hidrofóbicos para desestabilizar el C-terminal y que quizás las deleciones producidas en el residuo 202 de apoA-I de carpa sean esenciales para lograr una estructura con mayor afinidad por los lípidos. Es importante destacar que estas deleciones entre peces teleósteos solo esta presente en carpa y anguila.

Como se señaló anteriormente, varios mecanismos han sido propuesto para la interacción de HDL y apoA-I a la superficie celular y desencadenar el proceso de eflujo de colesterol libre y fosfolípidos desde las células. En nuestro estudio evaluamos la capacidad de apoA-I de interaccionar con la membrana celular sin la participación de los receptores de membrana más conocidos en interactuar con HDL y apoA-I (SR-BI y ABCA-I). Esto fue posible con la utilización de una línea celular (BHK-21) que no expresa estos receptores. Dado esta cualidad, esta línea celular ha sido utilizada para evaluar la participación de estos receptores en diversos procesos celulares (Brundert y col., 2003 y Oram y col., 2001). El análisis mostrado en la Figura 20, revela una interacción tanto de HDL como de apoA-I de carpa con la membrana celular de las

células BHK-21 después de 20 minutos de incubación. Este resultado fue confirmado con el experimento mostrado en la Figura 21 donde fue posible inmunodetectar apoA-I en la fracción de membrana plasmática de las células BHK tratadas en las mismas condiciones que el análisis anterior. Esto revela que apoA-I de carpa probablemente mantenga la habilidad de extraer colesterol y fosfolípidos mediante el mecanismo de microsolubilización de membrana observado para apoA-I de humano y para otras apolipoproteínas (Gillotte y col., 1999). Esto podría ser explicado con lo descrito por Chambenoit y col., (2001), quien describe que la interacción de apoA-I con macrófagos no sería mediada por la interacción directa entre proteína-proteína (apoA-I y ABCA1), sino que mediante dominios de membranas ricos en colesterol presentes en la membrana como consecuencia de la presencia del receptor. Experimentos realizados en nuestro laboratorio y publicados por Concha y col., (2005), demostraron que apoA-I de carpa es capaz de interaccionar fuertemente con membranas de borde en cepillo de carpa (BBM) y que tal interacción sería altamente dependiente de la temperatura, lo que indicaría una importante participación de los lípidos de membrana en tal interacción. Además, no se observó saturación en la unión de altas concentraciones de apoA-I a las BBM, lo que indica la ausencia de sitios de unión de alta afinidad. También se demostró que tal unión a las BBM soportaría en un 50 % los lavados con buffer carbonato/EDTA, comportándose de esta forma, como proteína integral de membrana. Estos antecedentes corroboran la idea de que apoA-I es capaz de interaccionar con la membrana plasmática sin la mediación de receptores.

Este mecanismo de microsolubilización de membrana no seria dependiente de residuos específicos en la estructura de la proteína sino que estarían involucradas las

características estructurales generales predominantes en la estructura de apoA-I. Esto por lo observado con distintas apolipoproteínas que poseen características estructurales similares a apoA-I, también poseen una cierta capacidad para mediar el eflujo de colesterol libre y fosfolípidos desde la membrana de células enriquecidas con colesterol. Dentro de la estructura también serian importantes residuos y secuencias aminoacídicas especificas, las cuales estarían encargadas de interaccionar con proteínas como lo son LCAT y el receptor SR-B1 entre otros.

En el caso de los espermatozoides de bovino incubados con apoA-I y HDL de carpa, se quiso evaluar si apoA-I era capaz de interactuar con la membrana de estas células heterólogas.

Diversos autores han descrito que espermatozoides eyaculados frescos no son capaces de fertilizar el óvulo, sino que ellos deben primero sufrir capacitación y reacción acrosomal durante su transito a través del tracto reproductivo femenino para llegar completamente competentes a fertilizar el óvulo (Travis y Kopf, 2002). Existen varias líneas de evidencias que indican que en la capacitación de los espermatozoides estaría involucrado una disminución en la razón colesterol/fosfolípido en la membrana. Es conocido el efecto estabilizador de membrana del colesterol y es por esto que una disminución de éste haría más fluida la membrana facilitando de esta forma los movimientos flagelares del espermatozoide además de la reacción acrosomal. Se ha descrito que apoA-I y HDL son secretados en el tracto reproductivo femenino e interaccionarían con proteínas provenientes de los fluidos seminales ya unidas a la membrana del espermatozoide. Se ha postulado a apoA-I como la molécula mediadora

de desencadenar este cambio en la estructura de la membrana del espermatozoide (Therien y col, 1997).

El hecho de que una apoA-I proveniente de un organismo alejado evolutivamente de los mamíferos, como lo es la carpa, sea capaz de interaccionar con la membrana de espermatozoides de bovino, indica que elementos conservados en ambos componentes, proteína y membrana, son los responsables de dicha interacción, estos componentes serían una membrana rica en colesterol más la estructura canónica de las apoA-I (una estructura netamente α -helicoidal anfipática).

La presencia de grandes cantidades de colesterol en la membrana la hacen menos fluida, hecho que también puede ser inducido a bajas temperaturas, como en el experimento de la interacción de apoA-I con BHK-21. Esta falta de fluidez en la membrana podría estar afectando la disposición de las moléculas que componen la membrana y provocar la exposición de grupos hidrofóbicos o quizás provocar la formación de perturbaciones en la superficie de la membrana que facilitarían la interacción de apoA-I con las membranas. Esto sucede en el caso de las vesículas de DMPC, donde a su temperatura de transición (24°C) se producen defectos en la matriz lipídica que hacen más fácil la interacción de apoA-I con los lípidos que forman la vesícula (Laccotripe y col, 1997).

Finalmente, de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo se puede delinear las siguientes conclusiones:

- Se obtuvo la secuencia completa del cDNA de apoA-I de carpa (1323 bp), la cual codifica para una proteína de 257 residuos aminoacídicos.
- Se determinó mediante alineamiento múltiple que sin importar la cercanía evolutiva entre especies la homología es mayor en el extremo amino que en el extremo carboxilo terminal.
- Se obtuvo mediante análisis de predicción de estructura secundaria un contenido mayoritariamente α-helicoidal para carpa que para humano.
- Del análisis de las repeticiones de 11 aminoácidos fue posible encontrar un patrón en la distribución de los residuos, muy similar tanto para carpa como para humano y que sería la base tanto para aspectos estructurales como funcionales, por ej: la interacción con lípidos.
- El análisis mediante "helical wheel" de la secuencia consenso que forma cada repetición de 11 aminoácidos en apoA-I muestra una distribución de los residuos que corresponde a una α-hélice anfipática de clase A.
- Se obtuvo una aproximación estructural de apoA-I de carpa mediante modelamiento por homología a partir de la estructura cristalina de un fragmento de apoA-I de humano.

- Fue posible purificar tanto HDL como apoA-I de carpa y humano con un alto grado de pureza.
- Se determinó que apoA-I de carpa es más eficiente en la interacción con vesículas de DMPC que apoA-I de humano.
- Se demostró que el extremo C-terminal de apoA-I de carpa es importante en la interacción con vesículas de DMPC.
- Se demostró la interacción de apoA-I y de HDL de carpa con la membrana de células de mamíferos (BHK-21) y también a espermatozoides eyaculados de bovino.

6. REFERENCIAS.

Ajees, A. A., Anantharamaiah, G. M., Mishra, V. K., Hussain, M. M. y Murthy, H. M., (2006) Crystal structure of human apolipoprotein A-I: insights into its protective effect against cardiovascular diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103**, 2126-31.

Akerlof, E., Jornvall, H., Slotte, H. y Pousette, A., (1991) Identification of apolipoprotein A1 and immunoglobulin as components of a serum complex that mediates activation of human sperm motility. *Biochemistry*. **30**, 8986-90.

Amthauer, R., Concha, M., Villanueva, J. y Krauskopf, M., (1988) Interaction of cibacron blue and anilinonaphthalenesulphonate with lipoproteins provides a new means for simple isolation of these plasma proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* **154**, 752-7.

Amthauer, R., Concha M., Villanueva J. y Krauskopf M. (1989) Characterization of major plasma apolipoproteins of the high density lipoprotein in the carp (*Cyprinus carpio*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **92B**, 787-793.

Amthauer, R. (1990). Estudios sobre la lipoproteína de alta densidad del pez Cyprinus carpio. Síntesis de la apolipoproteína A-I durante aclimatación. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, p. 153.

Babin, P. J. y Vernier, J. M., (1989) Plasma lipoproteins in fish. J Lipid Res. 30, 467-89.

Blobel, G. y Dobberstein, B., (1975) Transfer to proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. *J Cell Biol.* **67**, 852-62.

Bolaños-Garcia, V. M. y Nuñez, R. M., (2003) On the structure and function of apolipoproteins: more than a family of lipid-binding proteins. *Prog Biophys Mol Biol.* **83**, 47-68.

Bolte, G., Knauss, M., Metzdorf, I. y Stern, M., (1997) Dot blot chemiluminescence assay for studying food protein binding to small intestinal brush border membranes in vitro. *J Biochem Biophys Methods*. **34**, 189-203.

Bolte, G., Knauss, M., Metzdorf, I. y Stern, M., (1998) Postnatal maturation of rat small intestinal brush border membranes correlates with increase in food protein binding capacity. *Dig Dis Sci.* **43**, 148-55.

Borhani, D. W., Rogers, D. P., Engler, J. A. y Brouillette, C. G., (1997) Crystal structure of truncated human apolipoprotein A-I suggests a lipid-bound conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**, 12291-6.

Brouillette, C. G., Anantharamaiah, G. M., Engler, J. A. y Borhani, D. W., (2001) Structural models of human apolipoprotein A-I: a critical analysis and review. *Biochim Biophys Acta*. **1531**, 4-46. Brundert, M., Heeren, J., Greten, H. y Rinninger, F., (2003) Hepatic lipase mediates an increase in selective uptake of HDL-associated cholesteryl esters by cells in culture independent from SR-BI. *J Lipid Res.* **44**, 1020-32.

Burger, D. y Dayer, J. M., (2002) High-density lipoprotein-associated apolipoprotein A-I: the missing link between infection and chronic inflammation? *Autoimmun Rev.* **1**, 111-7.

Byrnes, L., Luo, C. C., Li, W. H., Yang, C. Y. y Chan, L., (1987) Chicken apolipoprotein A-I: cDNA sequence, tissue expression and evolution. *Biochem Biophys Res Commun.* **148**, 485-92.

Chambenoit, O., Hamon, Y., Marguet, D., Rigneault, H., Rosseneu, M. y Chimini, G., (2001) Specific docking of apolipoprotein A-I at the cell surface requires a functional ABCA1 transporter. *J Biol Chem.* **276**, 9955-60.

Chapman, M. J., (1980) Animal lipoproteins: chemistry, structure, and comparative aspects. *J Lipid Res.* **21**, 789-853.

Chomczynski, P.y Sacchi, N., (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* **162**, 156-9.

Concha, M. I., Smith, V. J., Castro, K., Bastias, A., Romero, A. y Amthauer, R. J., (2004) Apolipoproteins A-I and A-II are potentially important effectors of innate immunity in the teleost fish Cyprinus carpio. *Eur J Biochem.* **271**, 2984-90.

Concha, M. I., Molina, S., Oyarzun, C., Villanueva, J. y Amthauer, R., (2003) Local expression of apolipoprotein A-I gene and a possible role for HDL in primary defence in the carp skin. *Fish Shellfish Immunol.* **14**, 259-73.

Concha, M. I., Lopez, R., Villanueva, J., Baez, N. y Amthauer, R., (2005) Undetectable apolipoprotein A-I gene expression suggests an unusual mechanism of dietary lipid mobilization in the intestine of Cyprinus carpio. *J Exp Biol.* **208**, 1393-9.

Cornette, J. L., Cease, K. B., Margalit, H., Spouge, J. L., Berzofsky, J. A. y DeLisi, C., (1987) Hydrophobicity scales and computational techniques for detecting amphipathic structures in proteins. *J Mol Biol.* **195**, 659-85.

Corsico, B., Toledo, J. D. y Garda, H. A., (2001) Evidence for a central apolipoprotein A-I domain loosely bound to lipids in discoidal lipoproteins that is capable of penetrating the bilayer of phospholipid vesicles. *J Biol Chem.* **276**, 16978-85.

De Smet, H., Blusa, R. y Monees, L. (1998) Absence of albumin in the plasma of the common carp Cyprinus carpio: binding of acids to high density lipoprotein. *Fish Physiology and Biochemitry*. **19**, 71-81.
Devillers-Thiery, A., Kindt, T., Scheele, G. y Blobel, G., (1975) Homology in aminoterminal sequence of precursors to pancreatic secretory proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **72**, 5016-20.

Francis, G. A., Knopp, R. H. y Oram, J. F., (1995) Defective removal of cellular cholesterol and phospholipids by apolipoprotein A-I in Tangier Disease. *J Clin Invest.* **96**, 78-87.

Frank, P. G., Bergeron, J., Emmanuel, F., Lavigne, J. P., Sparks, D. L., Denefle, P., Rassart, E. y Marcel, Y. L., (1997) Deletion of central alpha-helices in human apolipoprotein A-I: effect on phospholipid association. *Biochemistry*. **36**, 1798-806.

Frank, P. G. y Marcel, Y. L., (2000) Apolipoprotein A-I: structure-function relationships. *J Lipid Res.* **41**, 853-72.

Gillotte, K. L., Zaiou, M., Lund-Katz, S., Anantharamaiah, G. M., Holvoet, P., Dhoest, A., Palgunachari, M. N., Segrest, J. P., Weisgraber, K. H., Rothblat, G. H. y Phillips, M. C., (1999) Apolipoprotein-mediated plasma membrane microsolubilization. Role of lipid affinity and membrane penetration in the efflux of cellular cholesterol and phospholipid. *J Biol Chem.* **274**, 2021-8. Gordon, J. I., Sims, H. F., Lentz, S. R., Edelstein, C., Scanu, A. M. y Strauss, A. W., (1983) 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.* **258**, 4037-44.

Hammad, S. M., Stefansson, S., Twal, W. O., Drake, C. J., Fleming, P., Remaley, A., Brewer, H. B., Jr. y Argraves, W. S., (1999) Cubilin, the endocytic receptor for intrinsic factor-vitamin B(12) complex, mediates high-density lipoprotein holoparticle endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**, 10158-63.

Hermann, M., Lindstedt, K. A., Foisner, R., Morwald, S., Mahon, M. G., Wandl, R., Schneider, W. J. y Nimpf, J., (1998) Apolipoprotein A-I production by chicken granulosa cells. *Faseb J.* **12**, 897-903.

Inostroza, J., Vera, M. I., Goicoechea, O., Amthauer, R., y Krauskopf, M. (1990). Apolipoprotein A-I síntesis during the acclimatization of the carp (Cyprinus carpio). *J. Exp. Zool.*, **256**, 8-15.

Ji, Y. y Jonas, A., (1995) Properties of an N-terminal proteolytic fragment of apolipoprotein AI in solution and in reconstituted high density lipoproteins. *J Biol Chem.* **270**, 11290-7.

Karathanasis, S. K., Zannis, V. I. y Breslow, J. L., (1983) Isolation and characterization of the human apolipoprotein A-I gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **80**, 6147-51.

Kiss, R. S., Kay, C. M. y Ryan, R. O., (1999) Amphipathic alpha-helix bundle organization of lipid-free chicken apolipoprotein A-I. *Biochemistry*. **38**, 4327-34.

Kozyraki, R., Fyfe, J., Kristiansen, M., Gerdes, C., Jacobsen, C., Cui, S., Christensen, E. I., Aminoff, M., de la Chapelle, A., Krahe, R., Verroust, P. J. y Moestrup, S. K., (1999) The intrinsic factor-vitamin B12 receptor, cubilin, is a high-affinity apolipoprotein A-I receptor facilitating endocytosis of high-density lipoprotein. *Nat Med.* **5**, 656-61.

Krieger, M., (2001) Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems. *J Clin Invest.* **108**, 793-7.

Laemmli, U. K., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**, 680-5.

Laccotripe, M., Makrides, S. C., Jonas, A. y Zannis, V. I., (1997) The carboxyl-terminal hydrophobic residues of apolipoprotein A-I affect its rate of phospholipid binding and its association with high density lipoprotein. *J Biol Chem.* **272**, 17511-22.

Law, S. W. y Brewer, H. B., Jr., (1984) Nucleotide sequence and the encoded amino acids of human apolipoprotein A-I mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **81**, 66-70.

Lin, G., (2002) Insights of high-density lipoprotein apolipoprotein-mediated lipid efflux from cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **291**, 727-31.

Lindstedt, L., Saarinen, J., Kalkkinen, N., Welgus, H. y Kovanen, P. T., (1999) Matrix metalloproteinases-3, -7, and -12, but not -9, reduce high density lipoprotein-induced cholesterol efflux from human macrophage foam cells by truncation of the carboxyl terminus of apolipoprotein A-I. Parallel losses of pre-beta particles and the high affinity component of efflux. *J Biol Chem.* **274**, 22627-34.

Metcalf, V. J., Brennan, S. O., Chambers, G. y George, P. M., (1999) High density lipoprotein (HDL), and not albumin, is the major palmitate binding protein in New Zealand long-finned (Anguilla dieffenbachii) and short-finned eel (Anguilla australis schmidtii) plasma. *Biochim Biophys Acta*. **1429**, 467-75.

Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. y von Heijne, G., (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* **10**, 1-6.

Oram, J. F., Vaughan, A. M. y Stocker, R., (2001) ATP-binding cassette transporter A1 mediates cellular secretion of alpha-tocopherol. *J Biol Chem.* **276**, 39898-902.

Paul-Hayase, H., Rosseneu, M., Robinson, D., Van Bervliet, J. P., Deslypere, J. P. y Humphries, S. E., (1992) Polymorphisms in the apolipoprotein (apo) AI-CIII-AIV gene cluster: detection of genetic variation determining plasma apo AI, apo CIII and apo AIV concentrations. *Hum Genet.* **88**, 439-46. Phillips, M. C., Gillotte, K. L., Haynes, M. P., Johnson, W. J., Lund-Katz, S. y Rothblat,G. H., (1998) Mechanisms of high density lipoprotein-mediated efflux of cholesterol fromcell plasma membranes. *Atherosclerosis.* **137** Suppl, S13-7.

Pownall, H. J., Massey, J. B., Kusserow, S. K. y Gotto, A. M., Jr., (1978) Kinetics of lipid--protein interactions: interaction of apolipoprotein A-I from human plasma high density lipoproteins with phosphatidylcholines. *Biochemistry*. **17**, 1183-8.

Rader, D. J., (2003) Regulation of reverse cholesterol transport and clinical implications. *Am J Cardiol.* **92**, 42J-49J

Rajavashisth, T. B., Dawson, P. A., Williams, D. L., Shackleford, J. E., Lebherz, H. y Lusis, A. J., (1987) Structure, evolution, and regulation of chicken apolipoprotein A-I. *J Biol Chem.* **262**, 7058-65.

Saito, H., Dhanasekaran, P., Nguyen, D., Holvoet, P., Lund-Katz, S. y Phillips, M. C., (2003) Domain structure and lipid interaction in human apolipoproteins A-I and E, a general model. *J Biol Chem.* **278**, 23227-32.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2º Ed. Cold Spring Harbor, N.Y.

Sedmak, J. J. y Grossberg, S. E., (1977) A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Anal Biochem.* **79**, 544-52.

Shoulders, C. C., Kornblihtt, A. R., Munro, B. S. y Baralle, F. E., (1983) Gene structure of human apolipoprotein A1. *Nucleic Acids Res.* **11**, 2827-37.

Srinivas, R. V., Venkatachalapathi, Y. V., Rui, Z., Owens, R. J., Gupta, K. B., Srinivas, S. K., Anantharamaiah, G. M., Segrest, J. P. y Compans, R. W., (1991) Inhibition of virus-induced cell fusion by apolipoprotein A-I and its amphipathic peptide analogs. *J Cell Biochem.* **45**, 224-37.

Southern, E. M., (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* **98**, 503-17.

Tada, N., Sakamoto, T., Kagami, A., Mochizuki, K. y Kurosaka, K., (1993) Antimicrobial activity of lipoprotein particles containing apolipoprotein Al. *Mol Cell Biochem*. **119**, 171-8.

Tarugi, P., Albertazzi, L., Nicolini, S., Ottaviani, E. y Calandra, S., (1991) Synthesis and secretion of apolipoprotein A-I by chick skin. *J Biol Chem.* **266**, 7714-20.

Therien, I., Soubeyrand, S. y Manjunath, P., (1997) Major proteins of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by high-density lipoprotein. *Biol Reprod.* **57**, 1080-8.

Thompson, J. D., Higgins, D. G. y Gibson, T. J., (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-80.

Travis, A. J. y Kopf, G. S., (2002) The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. *J Clin Invest.* **110**, 731-6.

von Heijne G., (1983) Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. *Eur. J. Biochem.* **133**: 17-21, 1983.

Wang, L., Atkinson, D. y Small, D. M., (2005) The interfacial properties of ApoA-I and an amphipathic alpha-helix consensus peptide of exchangeable apolipoproteins at the triolein/water interface. *J Biol Chem.* **280**, 4154-65.

Weiler-Guttler, H., Sommerfeldt, M., Papandrikopoulou, A., Mischek, U., Bonitz, D., Frey, A., Grupe, M., Scheerer, J. y Gassen, H. G., (1990) Synthesis of apolipoprotein A-1 in pig brain microvascular endothelial cells. *J Neurochem.* **54**, 444-50.