

2010 Octubre, 2(1): 1-2

CONFIGURACIÓN DE APOLIPOPROTEÍNA A-I EN HDL DISCOIDALES GENERADAS ESPONTÁNEAMENTE POR LA REACCIÓN CON VESÍCULAS DE DMPC.

Autores : Luz Angela Cuellar, Eduardo Daniel Prieto y Horacio Alberto Garda

Lugar de Trabajo: INIBIOLP, Facultad de Ciencias Médicas, Calles 60 y 120, 1900-La Plata.

Introducción

Las HDL discoidales (dHDL) son intermediarios importantes en el transporte reverso de colesterol. Por la dificultad de aislarlas, todo el conocimiento sobre su estructura se obtuvo en dHDL reconstituídas artificialmente. El método de reconstitución más usado es la diálisis de micelas mixtas con detergentes, pero también pueden generarse espontáneamente por la reacción con vesículas fosfolipídicas en la temperatura de transición de fase (Tt), un procedimiento que puede ser similar al que ocurre in vivo. Diferentes evidencias soportan el modelo del "doble cinturón", en el que cada una de las dos moléculas de apoAI en orientación antiparalela rodean a una bicapa lipídica discooidal. En el caso de dHDL obtenidas por diálisis con colato, estudios con reactivos entrecruzantes de lisinas detectan la presencia de al menos dos configuraciones (ver Fig 1). En la forma predominante (configuración 5/5) las hélices 5 de cada monómero quedan enfrentadas entre sí. En una forma minoritaria (configuración 5/2), la hélice 5 de una molécula de apoAI se enfrenta a la hélice 2 de la segunda molécula. Sin embargo, resultados previos de nuestro laboratorio usando entrecruzamiento de lisinas y espectrometría de masa (Prieto ED, Tesis doctoral) indicaron que la configuración depende del método de reconstitución. Además, estimaciones de la eficiencia de homotransferencia de energía entre residuos triptofano (Trp) en dHDL reconstituídas por ambos métodos con mutantes de único Trp (W@104 y W@108) sugieren que la configuración 5/2 sería predominante en estas dHDL. Ya que sólo la configuración 5/2 explica algunas propiedades de las dHDL como su interacción con membranas, es muy importante la confirmación de estos datos.

Objetivos

Para obtener información detallada sobre la configuración de apoAI en dHDL generadas espontáneamente (y con la meta futura de disponer de un método que permita estudios configuracionales en dHDL generadas por células), hemos construido tres mutantes de cisteína (K107C, K133C y K226C), las que fueron marcadas con Alexa-Fluor 488. Las distancias intermoleculares entre los residuos marcados fueron estimadas en dHDL generadas espontáneamente por la reacción con vesículas de DMPC a 24°C de la eficiencia de homotransferencia de energía.

Materiales y métodos

Construcción y marcación de mutantes: Las mutantes se obtuvieron por mutagénesis sitio dirigida y purificaron por cromatografía de afinidad por Ni luego de su expresión en bacterias. Estas se marcaron con Alexa Fluor-488 C5-maleimida. Del espectro de absorción, se determinó una estequiometría de marcado de $1:1 \pm 10\%$. El mismo tratamiento en apoAI salvaje indicó que el marcado inespecífico fue $< 5\%$.

Caracterización de las mutantes: Las mutantes (marcadas y no marcadas) se caracterizaron en cuanto a su correcto plegamiento por la emisión de triptofano (Trp) y curvas de denaturalización con guanidina-HCl; y en cuanto a su habilidad para micelizar vesículas de DMPC en la Tt.

Preparación de dHDL: Vesículas multilamelares de DMPC se incubaron a 24 °C con las proteínas en una relación molar de 40/1. Luego de 8 horas, ciclos de temperatura por encima y debajo de Tt se usaron para homogeneizar el tamaño de las dHDL, el que fue estimado en 10 nm por PAGGE.

Aplicación de homotransferencia de energía para la estimación de distancias intermoleculares: Se prepararon dHDL conteniendo diferentes proporciones de la mutante marcada y apoAI salvaje. Gráficos de la anisotropía de fluorescencia del Alexa 488 (r) en función de la fracción molar de proteína marcada (fm) permitieron obtener la anisotropía en ausencia (r1) y presencia (r2) de homotransferencia de energía de acuerdo con: $r = r1 - (r1 - r2) fm$. Estos valores se usaron para calcular las distancias intermoleculares promedio entre

2010 Octubre, 2(1): 1-2

los correspondientes residuos marcados por las siguientes expresiones aproximadas dadas por Zou y col. (Biophys J 2007 92-L27). La posible influencia de la depolarización por la movilidad rotacional también se consideró de acuerdo con Runnels and Scarlatta (Biophys J 1995 69-1569).

Resultados

Ni las mutaciones ni la marcación afectan el correcto plegado ni la habilidad de generar dHDL por la reacción con vesículas de DMPC. En las dHDL, la anisotropía disminuyó linealmente con la fracción molar de proteína marcada, lo que permitió estimar r_1 y r_2 . La distancia intermolecular promedio entre los residuos 133 fue estimada entre 2,5 y 2,8 nm con un error estandar menor al 10%, mientras que para las correspondientes a las posiciones 107 y 226 se estimó un límite máximo de 1,5 nm.

Conclusiones

En las dHDL generadas espontáneamente por reacción con vesículas de DMPC, las distancias intermoleculares entre los residuos homólogos 107 y 1333 son totalmente compatibles con la configuración "doble cinturón 5/2". Los resultados con la proteína marcada en posición 226, sin embargo, son más compatibles con la configuración 5/5. Independientemente de la organización del extremo C, la corta distancia intermolecular del residuo 107 indica que los pares de hélices 3-4 se encuentran enfrentados en estas dHDL. Esto permitiría la formación de un ramillete intermolecular entre estos pares de hélices que puede explicar sus propiedades de inserción en la membrana.