

2010 Octubre, 2(1): 1-2

RESPUESTA CELULAR DIFERENCIAL A Δ K107, UNA MUTANTE NATURAL DE APOLIPOPROTEINA A-I HUMANA

Autores : Juan D.Toledo, Laura V.Cabaleiro**, Marina C. Gonzalez and Horacio A.Garda

Lugar de Trabajo: INIBIOLP-CONICET/UNLP, Fac de Cs. Medicas,.Universidad Nacional de La Plata, Calle 60 y 120, La Plata,1900. Argentina e-mail de contacto (jtoledo@atlas.med-unlp.edu.ar)

Introducción

La ApolipoproteínaA-I (apoAI) es la proteína mayoritaria de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y desempeña un rol clave en el transporte reverso de colesterol (Col), proceso de gran importancia antiaterogénica. La interacción de apoAI con sitios específicos en la membrana celular, desencadena múltiples vías de señalización, alguna de ellas, movilizan pools intracelulares de col hacia la membrana celular, como el disponible para esterificación por col acil transferasa (ACAT). ApoAI esta constituida principalmente por repeticiones de α -hélices anfipáticas tipo A, y dos repeticiones con una particular distribución de cargas eléctricas denominadas tipo Y. Una de ellas se encuentra en el centro de la molécula y el otro en el extremo Carboxilo.(C) Estos dominios fueron propuestos como responsables de jugar un papel clave en el eflujo lipídico celular mediado por apoAI. En nuestro laboratorio hemos postulado que las conformaciones alternativas en las helices centrales tipo Y, podrían modular la interacción con células y la movilización de pools intracelulares de col.. Pacientes portadores de una variante de apoAI con una deleción en la región helicoidal central tipo Y (Δ K107) tienen un metabolismo de HDL alterado y riesgo aterogénico aumentado. Esta deleción podría alterar el registro de la hélice y modificar las propiedades de unión a lípidos y/o la interacción con proteínas celulares del dominio central tipo Y.

Objetivos

Evaluar si las respuestas celulares a Δ K107 están modificadas, y probar el papel funcional del dominio helicoidal central tipo Y, comparando el comportamiento de Δ K107 con apoAI tipo salvaje y una mutante donde el residuo equivalente del segmento helicoidal tipo Y de la región C terminal fue eliminado (Δ K226). Se utilizaron Macrófagos RAW 264.7 para comparar: el eflujo celular de col y fosfolípidos (FL) de colina, como esfingomielina (SM) y fosfaditilcolina (PC) y la movilización del pools intracelular de col disponible para esterificación por ACAT.

Materiales y métodos

Obtención variantes de apoA-I: ApoA-I sérica: Se purificó de suero humano (donado por el Instituto de Hemoterapia de La Plata). ApoA-I recombinante tipo salvaje: El vector de expresión pET30 con el inserto del cDNA de apoAI (donado por A.Jonas, University of Illinois) fue modificado en nuestro laboratorio por mutagénesis sitio dirigida (kit Quickchange de Stratagene) para permitir clivaje en medio ácido de la cola de polihistidina. Mutantes Δ K107 y Δ K226: Al cDNA de Δ K107 en pET30 (donado por A. Jonas) se le introdujo el sitio de clivaje. y al cDNA salvaje se le introdujo la deleción del codón correspondiente al residuo 226. Ensayo de MTT: Se cuantifica el aumento de absorbancia a 540 nm por conversión del 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromid (MTT) en formazán. Se comparó el funcionamiento mitocondrial en células cargadas con y sin colesterol. Análisis de la remoción de col y FL: Las células fueron tratadas con medio conteniendo colesterol (50 μ g/ml) y 3 [H] colesterol (0.5 μ Ci/ml) y/o 14 [C] fosfocolina complementadas con albúmina de suero bovino (2 mg/ml) durante 41 horas. Luego del tratamiento con apoA-I y las rHDL por 12 horas, el medio fue colectado y la remoción fue calculada como porcentaje relativo a la radioactividad total incorporada en las células. Se estímulo con bromoadenosina antes (8 hs) y durante el tratamiento proteico para obtener valores cuantificables de eflujo. Pools específicos de Co para ACAT y Relación FC/EM: Los lípidos celulares fueron extraídos por el método Bligh and Dyer y las muestras fueron resueltas por cromatografía en capa fina (TLC). Los valores fueron obtenidos a partir de la relación EC (ésteres de col)/Col y FC/EM. Expresión de ACAT1: Parte de las monocapas celulares fueron tratadas con buffer muestra y separadas por PAGGE nativo. Luego de su transferencia fueron expuestas con anticuerpos específicos anti-ACAT1 y reveladas por ECL. Cuantificación de gotas lipídicas: Se

2010 Octubre, 2(1): 1-2

usó tinción con Oil Red para comparar su acumulación en células RAW tratadas o no con Δ K107.

Resultados

La funcionalidad mitocondrial no resultó afectada por la carga de col hasta 70 μ g/ml, según el ensayo de MTT. Todas las variantes de apoA-I promueven la remoción (R) celular de col a 10 y 30 μ g/ml luego de 12 hs de tratamiento. En células RAW, solamente la mutante Δ K107 aumenta la cantidad de acil-CoA acil transferasa (ACAT).

No se observaron diferencias en la relación de radiactividad de col libre a esterificado por incubación con apoA-I y sus variantes de delección como así tampoco en la cuantificación de gotas lipídicas en células incubadas con Δ K107. El eflujo de FL de colina a 12 horas de tratamiento con las tres apoproteínas fue similar al obtenido en el control. Sin embargo, el análisis de los lípidos celulares mostró un aumento en la relación de radiactividad FC/EM.

Conclusiones

La carga de colesterol en las células RAW, realizada para cuantificar el eflujo de col, no afectó la funcionalidad mitocondrial. La delección de lys 107 presente en la hélice central y de lys 226 en la hélice del extremo C no modifican la R de col comparado con apoA-I sérica y recombinante. Observamos que aún a bajas concentraciones de proteína, aumenta la R de col respecto a los valores del control. Esta R desde la membrana plasmática no es indicativa de movilización de depósitos endógenos. Asimismo observamos un incremento en la expresión de ACAT cuando las células fueron estimuladas con Δ K107 con respecto a aquellas incubadas con Δ K226, apoA-I salvaje o los controles. A pesar de dicho aumento en la expresión de ACAT no observamos incremento en la relación EC/Co ni en la acumulación de gotas lipídicas celulares; esto podría deberse a la baja actividad esterificante posiblemente por carencia de algún sustrato necesario para su actividad. Luego de 12 hs de incubación las proteínas fueron inactivas en desencadenar la remoción de FL en células RAW. Sin embargo, en los lípidos celulares se observó aumento de la relación FC/EM por el tratamiento de apoA-I y sus variantes de delección.