

2010 Diciembre, 2(2): 1-2

## CONFIGURACIÓN DE LA APOLIPOPROTEÍNA A-I ( LL5/2 en dHDL) FISIOLÓGICAMENTE ACTIVA EN LA REMOCIÓN DE COLESTEROL DE CELULAS RAW

Cuellar A, Prieto E, Cabaleiro L, Garda H

*Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP)*

e-mail: [luzangelacuellar@gmail.com](mailto:luzangelacuellar@gmail.com)

### Introducción

Las lipoproteínas discoidales de alta densidad (dHDL) son intermediarios fundamentales en el eflujo lipídico celular mediado por la apolipoproteína A-I (apoAI). Los mismos son secretados por el hígado o se originan por la interacción de apoAI con células en un proceso mediado por el transportador ABCA1. Debido a la dificultad para su aislamiento, la mayoría del conocimiento sobre estos complejos proviene de estudios con dHDL reconstituídas. El método más usado para ello es diálisis con detergente (1), aunque las dHDL también pueden obtenerse por la reacción espontánea de apoAI con las vesículas fosfolipídicas a la temperatura de transición de fase, un procedimiento que puede tener similitud con la lipidación "in vivo" de apoAI.

Es bien conocido que las dHDL consisten de una bicapa lipídica discoidal rodeada por dos moléculas anti-paralelas de apoAI con sus hélices perpendiculares a las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos. En dHDL obtenidas por diálisis de colato, Silva et al. (2) detectaron dos ordenamientos co-existentes: Uno con la hélice-5 de cada molécula de apoAI en yuxtaposición (LL5/5) y la segunda con la hélice-5 de la molécula apoAI en yuxtaposición con la hélice 2 (LL5/2). Sin embargo, no existen datos sobre si esta configuración también ocurre en las dHDL generadas por células o mediante la reacción con vesículas lipídicas en ausencia de detergentes.

### Objetivo

A) Comparar la configuración de apoAI en las dHDL generadas espontáneamente con aquellas obtenidas por diálisis con detergentes. Para ello, nos propusimos determinar ciertas distancias intermoleculares por medidas de homotransferencia de energía de resonancia (homo FRET) usando dos mutantes de triptófano único (W@104 y W@108) y tres mutantes de cisteína marcada con Alexa-488 (K107C, K133C y K226C)

B) Comparar la funcionalidad de las dHDL obtenidas por ambos métodos midiendo su capacidad para remover colesterol de células en cultivo (macrófagos murinos RAW 264,7)

### Materiales y métodos

Mutantes: Las mutantes se obtuvieron por mutagénesis sitio dirigida y purificaron por cromatografía de afinidad por Ni luego de su expresión en bacterias. Las mutantes de cisteína fueron marcadas con Alexa Fluor-488 C5-maleimida.

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 T<sub>t</sub> se usaron para homogeneizar el tamaño de las dHDL, el que fue estimado en 10 nm por PAGGE.

Análisis de eflujo de colesterol de células RAW: Células crecidas a confluencia y cargadas con <sup>14</sup>C-colesterol se trataron con dHDL. El % de remoción de colesterol se determinó por el porcentaje de radiactividad encontrado en el medio en relación a la radioactividad total (células + medio).

### Resultados y conclusiones

A) Las distancias determinadas por homo-FRET son compatibles con la coexistencia de las configuraciones 5/5 y 5/2 en las dHDL generadas por diálisis con colato, pero indican que la configuración 5/2 es predominante en las dHDL generadas por la reacción espontánea con vesículas fosfolipídicas.

B) Las dHDL generadas por la reacción espontánea con vesículas fosfolipídicas fueron más activas que las dHDL obtenidas por diálisis con colato para promover la remoción de colesterol celular, indicando que sólo la configuración 2/5 sería activa en este proceso.

*2010 Diciembre, 2(2): 2-2*

C) Como hemos propuesto recientemente (Prieto & Garda, Biochemistry 2010, en revisión), la interacción de apoA1 con membranas requiere de la formación de un ramillete intermolecular de las hélices centrales 3 y 4, que constituiría el dominio de inserción activo. En las dHDL, este ramillete sólo es posible con la configuración 2/5, hecho que explicaría que sólo esta configuración sea activa en promover eflujo de colesterol.