

2011 Octubre, 2(3): 1-2

Apolipoproteína A-I Helsinki: su Relación con Acil-Coa Colesterol Aciltransferasa (ACAT)

Juan D. Toledo, Laura V. Cabaleiro, Angela Cuellar, Horacio A. Garda y Marina C. Gonzalez.

Facultad de Cs. Médicas, Universidad Nacional de La Plata, INIBIOLP-CONICET, Calle 60 y 120, La Plata, Argentina.

E-mail: marinacego@hotmail.com

Introducción

Apolipoproteína A-I (apoA-I), es la proteína mayoritaria de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) la misma juega un rol clave en la respuesta antiaterogénica y en el transporte de colesterol reverso (TCR). Esta proteína está mayoritariamente compuesta por repeticiones de α -hélices anfipáticas de tipo A. Existen también dos regiones conformadas por hélices de tipo Y con una distribución particular de cargas; las mismas han sido propuestas que juegan un rol central en el eflujo lipídico mediado por apoA-I. Pacientes portadores de una variante de apoA-I con una delección en una hélice de tipo Y en la región central (Δ K107) tienen el metabolismo de las HDL alterado y un incrementado riesgo aterogénico.

Objetivos

Para estudiar si alguna de las respuestas celulares estaban alteradas hemos comparado a Δ K107 con apoA-I wild type y con otra variante con un residuo delecionado en una hélice tipo Y de la región C-terminal Δ K226. Macrófagos RAW 264.7 estimulados con las diferentes proteínas fueron usados para comparar la expresión y el pool de colesterol disponible para ser esterificado por acil CoA colesterol acil transferasa (ACAT). También hemos evaluado el eflujo de fosfolípidos de colina y el contenido intracelular de esfingomiélna y fosfatidilcolina.

Materiales y métodos

Análisis de la remoción de fosfolípidos: Las células fueron tratadas con medio conteniendo colesterol (50 μ g/ml) y 14 [C]-fosforilcolina complementadas con albúmina de suero bovino (2 mg/ml) durante 24 horas. Luego se cambió el medio de cultivo y se realizó un equilibrado de 8 horas. Posteriormente, se realizó el tratamiento con las distintas proteínas. Fue necesario incluir 0,5 mM de 8-bromoadenosina-3-5-cyclic monofosfato, Br-cAMP en el medio durante el equilibrado y el tratamiento para tener niveles cuantificables de remoción. Luego del tratamiento proteico por 12 horas, el medio fue colectado y la remoción fue calculada como porcentaje relativo a la radioactividad total incorporada en las células.

Análisis de Esfingomiélna (EM) y Fosfatidilcolina (FC): Después de la evaluación de remoción de fosfolípidos las especies lipídicas polares fueron extraídas de la monocapa mediante la técnica de Bligh Dyer y separadas por cromatografía en capa fina (TLC). La radioactividad de cada fracción se determinó mediante el programa ImageQuantTL del Storm 840.

Análisis del colesterol libre y esterificado: Luego del análisis de remoción de colesterol, los lípidos de la monocapa fueron extraídos mediante la técnica de Bligh Dyer y separados por cromatografía en capa fina (TLC) en silica gel desarrollada en hexano :éter etílico: ácido acético (80:20:1, v:v:v). Las fracciones lipídicas correspondientes a la fosfatidilcolina(FC) y esfingomiélna (EM) fueron identificadas con I_2 gaseoso. La radioactividad de cada fracción se determinó mediante el programa ImageQuantTL del Storm 840.

Expression de ACAT1: Parte de las monocapas celulares fueron usadas para analizar el contenido de ACAT1. Luego de la separación de las proteínas celulares por SDS-PAGE, las proteínas fueron reveladas con anticuerpo específico anti-ACAT1 y ECL.

Resultados

Hemos observado que Δ K107 pero no Δ K226 incrementó el nivel de proteína ACAT en diferentes condiciones de carga celular con colesterol (0, 10 o 50, μ g/ml Chol). Sin embargo, solo en el caso de que las células sean cargadas con LDL observamos un aumento en la actividad de ACAT. Todas las proteínas resultaron activas en promover el eflujo de fosfolípidos.

2011 Octubre, 2(3): 2-2

Conclusiones

Por mecanismos aún no totalmente dilucidados solo Δ K107 tiene la particularidad de sobreexpresar la proteína ACAT. La variante Δ K107 produce un incremento en la masa de EC/Col cuando los macrófagos son tratados con LDL indicando que la internalización por esta vía es la más apropiada para ser utilizado el sustrato por ACAT.