

2014 Noviembre, 2(2): 2-2

Patogenicidad de un mutante natural de la apolipoproteína A-I humana asociado a amiloidosis: inestabilidad y respuesta pro-inflamatoria

Autores: ROSÚ, S. A., RAMELLA, N.A., SCHINELLA, G.R., RÍOS, J. L., ANDUJAR, I., TRICERRI, M. A., RIMOLDI, O. J.

Lugar de Trabajo Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP)

Introducción

Varios mutantes naturales de apolipoproteína A-I humana son asociados con amiloidosis hereditaria. Si bien los mecanismos moleculares subyacentes de esta patología permanecen inciertos, se plantean dos posibilidades: Cambios conformacionales de la proteína que desencadenan un plegamiento anómalo de la misma, o la existencia de un ambiente inflamatorio crónico que favorezca el mal plegado ó pérdida de función. Ambas situaciones conducirían a la formación de agregados y depósito en distintos órganos, afectando su función con variable severidad.

Objetivos

- Examinar los efectos de Arg173Pro (un mutante puntual de Apo A-I) sobre estructura, estabilidad y tendencia a la agregación, como así también, su habilidad para unir ligandos putativos.
- Estudiar una posible activación de cascadas proinflamatorias, agregamos variantes naturales sobre células THP, una línea celular de monocitos humanos, y posteriormente medimos la liberación de TNF- α e IL- 1 β .

Materiales y Métodos

➤ **Desnaturalización química influenciada por agentes caotrópicos.**

Distintas variantes de apoA-I en buffer Tris 20 mM a pH 7.4 fueron tituladas con concentraciones crecientes de Gnd-HCl determinando en cada punto la fluorescencia intrínseca del triptófano mediante un espectrofluorómetro (excitación a 295nm, emisión de registro entre 310 y 420 nm).

➤ **Estudio de unión a ligandos putativos**

Las proteínas fueron incubadas a 0.2 mg/ml a una relación molar aproximada de 1 con la heparina, a 37 °C durante 72 h. Posteriormente se midió la fluorescencia asociada a Tioflavina. Se determinó la agregación en presencia del lípido dodecil sulfato de sodio (SDS) por debajo de su concentración micelar crítica (0,6 mM) a pH 7.4 y Ph 5.

➤ **Determinación de la posible activación de respuesta pro-inflamatoria sobre células THP-1.**

Se diferenciaron los monocitos a macrófagos con PMA durante 48hs. Se agregó proteína a una concentración de 5- 10 ug/ml, se incubó durante 3 horas. Posteriormente se realizó un ELISA para determinar liberación de IL-1 β y TNF- α

Resultados

Nuestros resultados indican que la mutación induce una drástica pérdida de estabilidad a pH fisiológico que podría determinar la alta tendencia a agregarse observada como complejos pro-amiloidogénicos. La incubación bajo condiciones ácidas no parece inducir desestabilización significativa, tampoco contribuye con la unión del mutante a SDS. Mientras que la unión a este detergente es mayor a pH neutro para el mutante comparado con w-t, la interacción de la variante Arg173Pro con heparina depende del pH, siendo más bajo pH 5 y más alto que W-T bajo condiciones fisiológicas. Arg173Pro indujo una mayor liberación de TNF- α e IL- 1 β por parte de las células THP, lo cual podría ser clave para perpetuar un microambiente proinflamatorio que incrementa el daño local del órgano afectado.

2014 Noviembre, 2(2): 2-2

Conclusión

Todo esto sugiere que cambios estructurales sutiles pueden inducir una conformación patológica de la apoA-I; la unión a ligandos como heparina y otros GAGs pueden ser eventos claves que demuestren la interacción con distintos componentes del entorno; y de manera interesante las vías por la que los mutantes causan enfermedad no son comunes a todos, lo que implica un gran desafío para entender la amiloidosis hereditaria inducida por esta proteína.

Los autores agradecen el apoyo de UNLP (M158), y CONICET (PIP PIP 112 201101-00648)

Fecha de Recibido: 04-10-14

Fecha de Publicación: 1-11-14