

## Mecanismes de transport intracel·lular . El model de la lipoproteïna lipasa.

R. Busca, M.A. Pujana, M.M. Fernández, M. Reina i S. Vilaró

Unitat de Biologia Cel·lular. Dept. de Bioquímica i Fisiologia. Universitat de Barcelona.

La lipoproteïna lipasa (LPL) és un enzim extracel·lular, responsable de la hidròlisi dels triacilglicèrids circulants en forma de lipoproteïnes. És sintetitzat a les cèl·lules parenquimals dels teixits (adipòcits, cardiomiòcits,...)(Vilaró i col., 1989; Camps et al., 190a,b,1991) i es transporta a través de les cèl·lules endotelials cap a la seva cara luminal on s'hi ancora mitjançant heparan o dermatan-sulfats (Olivecrona i Bengtsson-Olivecrona, 1987).

La hipertrigliceridèmia de tipus I és una malaltia hereditària causada per l'absència d'activitat lipoproteïna lipasa plasmàtica, deguda a deficiències del propi enzim LPL (Havel i Gordon, 1960) o del seu cofactor, apo-CII (Breckenridge i col., 1978). Deeb (Deeb i col., 1989) va descriure el gen de la lipoproteïna lipasa humana, format per un total de deu exons que s'extenen al genoma al llarg de 30 kb. Això va permetre, mitjançant tècniques d'anàlisi genòmica (PCR genòmica, SSCP) (Orita i col., 1989) descriure diverses mutacions al gen LPL causants d'hipertrigliceridèmia de tipus I (Hayden i col., 1991).

El treball al nostre laboratori se centra en la biologia cel·lular d'aquest enzim. Per tal d'esbrinar quins són els senyals que disposen el seu transport dins de la cèl·lula i entre les cèl·lules implicades ens plantegem la següent aproximació: fer una anàlisi de l'efecte que poden tenir sobre el transport algunes modificacions de la seqüència de la proteïna LPL. Al mateix temps volem produir proteïna LPL per a poder estudiar la seva estructura i relacions funcionals.

Pels estudis de transport varem decidir :

1. produir in vitro aquells mutants coneguts que se suposa que afecten el transport normal de la LPL.
2. produir in vitro aquells mutants de delecció que, per anàlisi de seqüències, podem suposar que afecten al transport de la proteïna i/o a la seva unió a receptors.

Els punts a modificar varen ser :

**R-1** : AA-43 . (Asn43->Ala). Descrit per Semenkovich i col. (1990) com un mutant que afecta el patró de N-glucosilació.

**R-2** : AA-142 . (Gly142->Glu). Descrit per Ameis i col. (1991) com un mutant que no permet la secreció de la proteïna a l'espai extracel·lular.

**R-3** : AA-291 . (Asn291->Ser). Descrit per Reina i col. (1992) com un mutant que reté la seva activitat funcional (hidròlisi de triacilglicèrids) però no s'uneix a heparina.

**R-4** : AA-388 . (Tyr388->Stop). Proteïna truncada al lloc de tall de la quimotripsina.

**R-5** : AA-428 . (Lys428->Stop). Proteïna truncada, careix del darrer pont di-sulfur.

**R-6** : AA-441 . (Lys441->Stop). proteïna truncada, careix dels darrers 18 AA.

Aquest mutants es varen produir mitjançant mutagènesi dirigida fent servir el kit de BioRad "MutaGene-TM Phagemid in vitro mutagenesis kit", sobre el cDNA-LPL humana. Aquest sistema fa servir la tècnica descrita per Kunkel (Kunkel i col, 1987). Una vegada

produïdes les mutacions es varen clonar els cDNA-mutats al vector d'expressió eucariota pCAGGS (Niwa i col., 1991) obtenint els plasmidis pCR1+ (AA-43), pCR2+ (AA-142), pCR3+ (AA-291), pCR4+ (Stop388), pCR5+ (Stop428) i pCR6+ (Stop441).

Per tal d'esbrinar si els mutants afectaven el transport de la proteïna es varen transfectar a cel·lules Cos7 utilitzant les tècniques del DEAE-Dextrà o de la lipofectina. Per tal de seguir el processament intracel·lular de la proteïna estem utilitzant la tècnica d'immunocitoquímica al microscopi òptic.

Resultats preliminars mostren que, almenys entre R1 i la proteïna LPL complerta, hi ha diferències en el seu processament intracel·lular.

Un dels principals limitants en l'estudi de la lipoproteïna lipasa ha estat sempre la disponibilitat de bons anticossos. La producció d'aquests ha estat sempre problemàtica, per una banda per la seva presència al plasma de l'animal immunitzat (baixa immunogenicitat), en segon lloc per la seva ràpida desaparició del plasma (captació hepàtica) i en tercer lloc per la dificultat de disposar de quantitats importants de proteïna.

Per a solventar aquestes limitacions vàrem decidir iniciar la producció de proteïna LPL a bacteris, escollint el sistema descrit per Studier (Studier i Moffatt, 1986; Rosenberg i col., 1987; Studier i col., 1990) i basat en l'ús de bacteris lisògens en el virus T7, i vectors d'expressió procariotes sota control d'un promotor T7. Hem fet servir el sistema pET19b (Novagen, Inc).

Els nostres resultats indiquen que podem obtenir una forta expressió de proteïna LPL a *E.coli* BL21(DE3) que suposa una concentració estimada d'LPL al medi de cultiu d'uns 100 micrograms/mL. Aquesta és la primera vegada que s'aconsegueix de produir LPL a bacteris. Actualment estem abordant la producció i purificació de la proteïna LPL madura i de les proteïnes mutades descrites anteriorment.

- Breckenridge W.C., J.A. Little, G. Steiner, A. Chow y M. Poapst col. (1978). *N. Engl. J. Med.* 298 : 1265.
- Camps L., M. Gafvels, M. Reina, C. Wallin, S. Vilaró y T. Olivecrona (1990b). *Biology of Reproduction* 42 : 917-927.
- Camps L., M. Reina, M. Llobera, G. Bengtsson-Olivecrona, T. Olivecrona y S. Vilaró (1991). *J. Lipid Res.* 32 : 1877-1885.
- Camps L., M. Reina, M. Llobera, T. Olivecrona y S. Vilaró (1990a). *American J. of Physiology* 258 : c673-c681.
- Havel, R. i R.S. Gordon (1960). *J. Clin. Invest.* 39 : 1777.
- Hayden M.R., Y. Ma, J.D. Brunzell i H. Henderson (1991). *Curr. Op. Lipidol.* 2 (2) : 104-109.
- Deeb S. i R. Liao (1989). *Biochemistry* 28 : 4131-4135.
- Kunkel Th.A., J.D. Roberts i R.A. Zakour (1987). *Methods Enzymol.* 154 :
- Ma Y., J. Kastelein, B. Wilson, G. Roedere, J.D. Brunzell i M.R. Hayden (1991). *American hearth Meeting, Anaheim.*
- Olivecrona, Th. y G. Bengtsson-Olivecrona (1987). *ch*". En "Lipoprotein Lipase", edit. by J. Borensztajn, Evener Publ. pp. 15-58.
- Reina M., J.D. Brunzell i S. Deeb (1992). *J. Lipid Res.* 33 : 1823-1832.
- Rosenberg A.H., B.N. Lade, D. Chui, S. Lin, J.J. dunn i F.W. Studier (1987). *Gene* 56 : 125.
- Semenkovich C.F., Ch-Ch. Luo, M.K. Nakanishi, S.H. Chen i L. Chan (1990). *J. Biol. Chem.* 265 : 5429-5433.
- Studier F.W., A.H. Rosenberg, J.J. Dunn i J.W. Duberoff (1990). *Meth. Enzymol.* 185 : 60-89.
- Studier F.W. i B.A. Moffatt (1986). *J. Mol. Biol.* 189 : 113-130.
- Vilaró S., L. Camps, M. Reina, J. Pérez-Clausell, M. Llobera y T. Olivecrona (1989). *Brain Research*, 506 : 249-253.