

El trànsit polaritzat de la subunitat $\beta 2$ del canal de sodi és dependent de l'associació a subdominis de membrana rics en colesterol

Èric Cortada^{1,3}, Robert Serradesanferm^{1,3}, Ramon Brugada^{1,2,3,4}, Marcel Verges^{1,2,3}

¹Universitat de Girona, Facultat de Ciències

²Universitat de Girona, Dept. de Ciències Mèdiques

³GenCardio (IDIBGI)

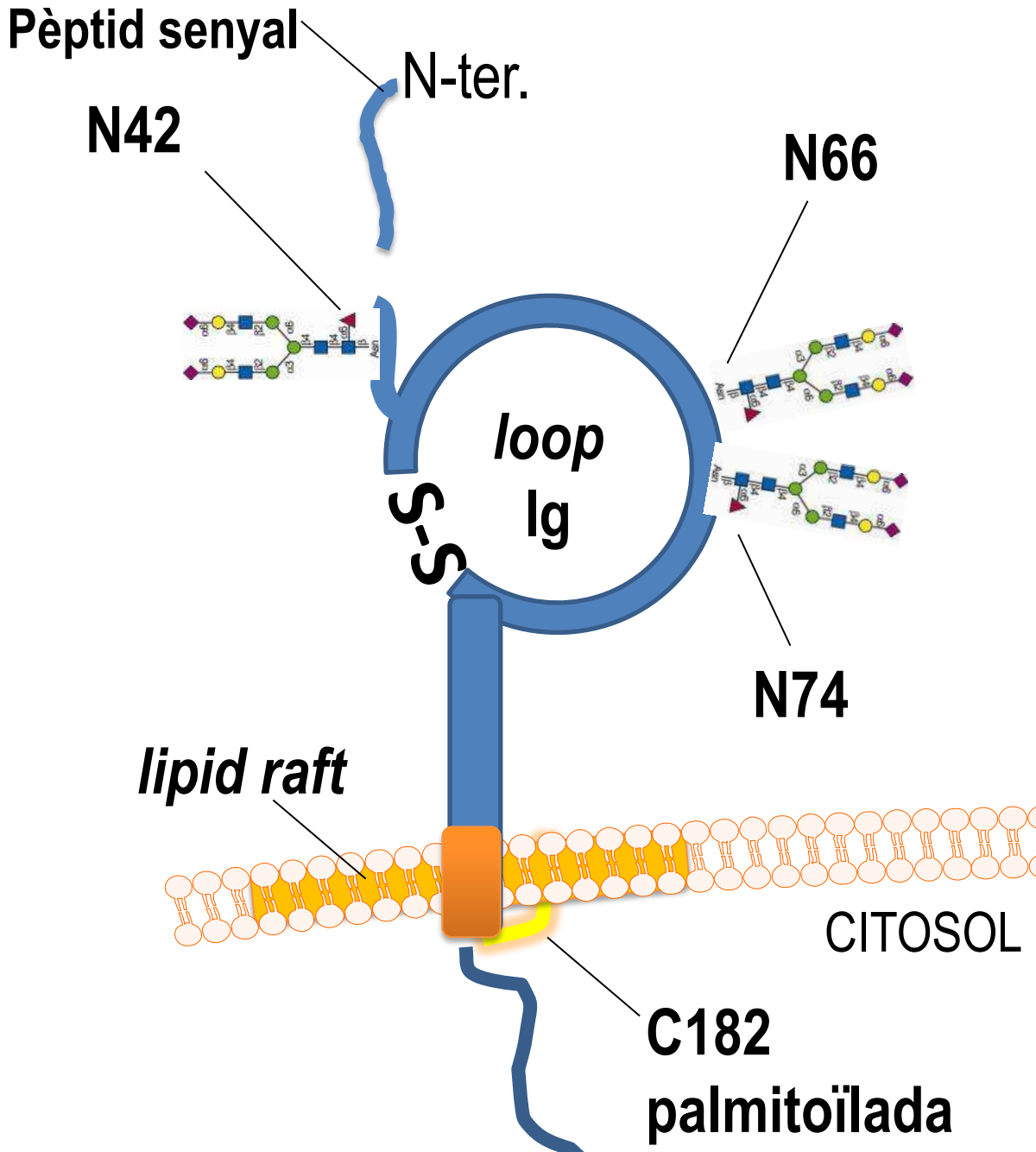
⁴CiberCV

INTRODUCCIÓ: La subunitat $\beta 2$ (codificada pel gen *SCN2B*) és una peça important del complex del canal de sodi cardíac dependent de voltatge. $\beta 2$ promou la correcta localització a la membrana plasmàtica de la subunitat α , $\text{Na}_v1.5$, formadora del porus del canal. El canal és essencial per a la conducció elèctrica cardíaca. Mutacions en $\beta 2$ resulten en menys canals a la superfície cel·lular, fenotip que es tradueix en malalties cardíques greus, i fins i tot la mort sobtada.

$\beta 2$ és una proteïna transmembrana. Estructuralment, en destaquem un *loop* del tipus *immunoglobulin-like* al domini extracel·lular, amb 3 llocs d'N-glicosil·lació que permeten a $\beta 2$ arribar a la superfície cel·lular. A la cua citoplasmàtica, just després del segment transmembrana, $\beta 2$ hi té una cisteïna que es pot palmitoïl·lar.

HIPÒTESIS: ● $\beta 2$ es distribueix de manera polaritzada en cèl·lules *Madin Darby canine kidney* (MDCK). Aquesta localització és dependent del contingut de colesterol de la membrana plasmàtica. ● La palmitoïl·lació de $\beta 2$ determina la seva localització en subdominis de membrana rics en colesterol (*lipid rafts*). ● β -secretase 1 (BACE1), una proteïna enriquida en *lipid rafts* cliva $\beta 2$ en cèl·lules MDCK.

MÈTODES: Cultiu de cèl·lules MDCK en Transwells. Aquestes cèl·lules creïxen polaritzades, desenvolupant dominis de membrana plasmàtica apical i basolateral, separats per unions estretes. Expressió exògena de $\beta 2$ fusionada a YFP o CFP, WT o C182S. $\beta 2$ C182S no pot ser palmitoïlada. Expressió exògena de BACE1. Immunofluorescència. Aïllament de *lipid rafts* (tot a 4°C): Cèl·lules s'homogenitzen amb xeringa i les membranes es precipiten per centrifugació. Les membranes s'homogenitzen amb xeringa en 1% detergent Tritó X-100 i s'ultracentrifuguen en gradient de sucrosa. Es recullen fraccions volumètriques de densitat creixent. Biotinilació de proteïnes de membrana (tot a 4°C): Les cèl·lules s'incuben en una solució de biotina-SS-NHS (Thermo). Llavors es llisten en 1% Tritó X-100. Es guarda 10% del llistat. La resta del llistat s'incuba en *beads* de NeutrAvidin-sepharose (Thermo) per separar les proteïnes biotinilades (per centrifugació).



Topologia de $\beta 2$: Té 215 residus, els 30 primers corresponen al pèptid senyal predit. Al domini extracel·lular hi ha un *loop* immunoglobulina (Ig) amb 3 llocs d'N-glicosil·lació. El segment transmembrana s'expandeix 20 residus. Adjacent al segment transmembrana hi ha la cisteïna-182, que es pot palmitoïl·lar.

CONCLUSIONS:

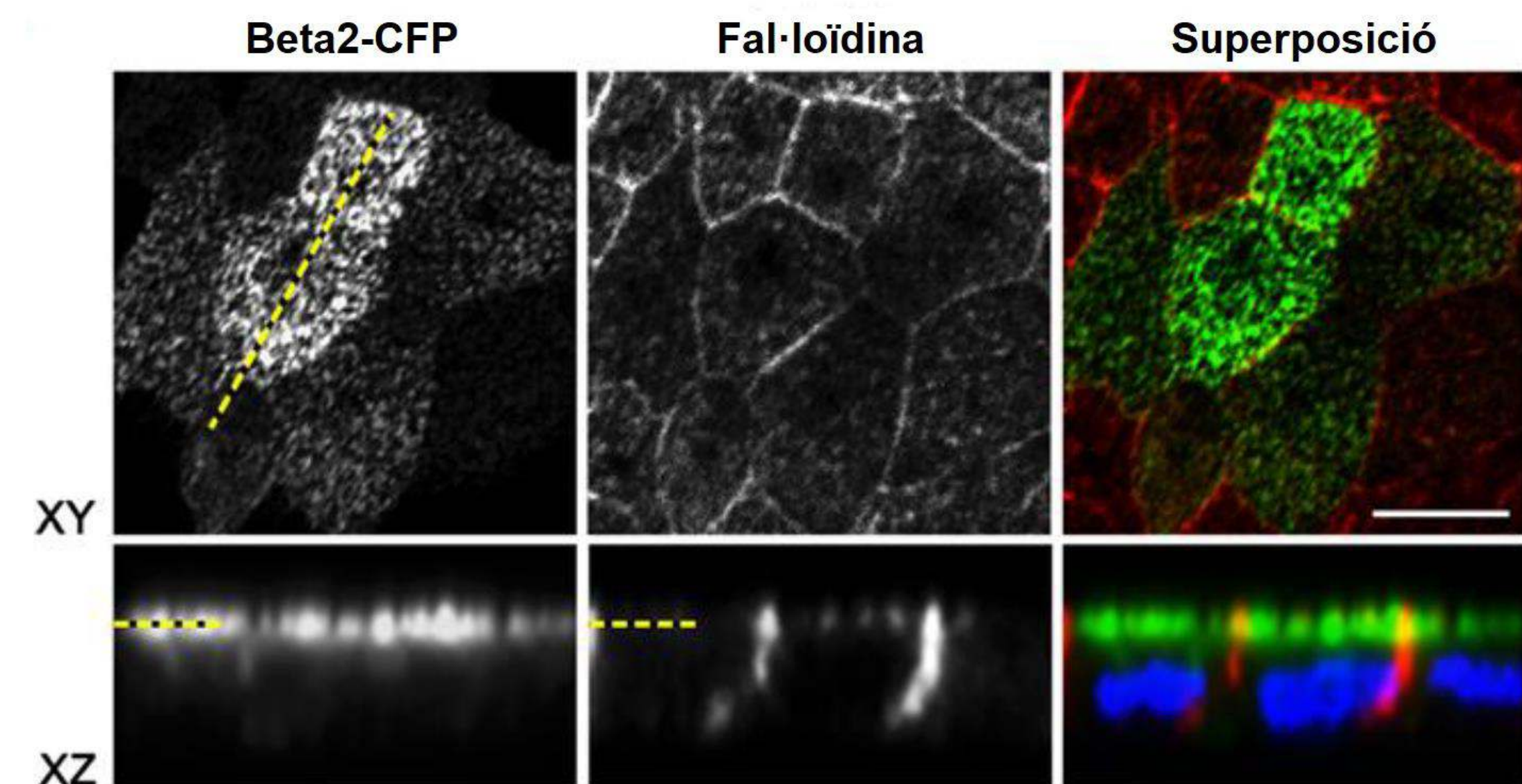
- ★ La localització al domini apical de $\beta 2$ depèn de la presència de colesterol a la membrana plasmàtica i del tràfic intracel·lular de colesterol.
- ★ La palmitoylació de C182 distribueix $\beta 2$ a *lipid rafts*.
- ★ En cèl·lules MDCK, BACE1 activa el clivatge seqüencial de $\beta 2$, un mecanisme potencial per regular la funció de $\beta 2$.

Missatge final:

Els elements estructurals de $\beta 2$ determinen el seu trànsit polaritzat a dominis especialitzats de la membrana plasmàtica. Conèixer el tràfic polaritzat de $\beta 2$ permet entendre la seva funció en guiar la correcta localització de la subunitat α del canal de sodi, contribuint a entendre de com es desenvolupen les arrítmies quan les subunitats del canal no es localitzen correctament.

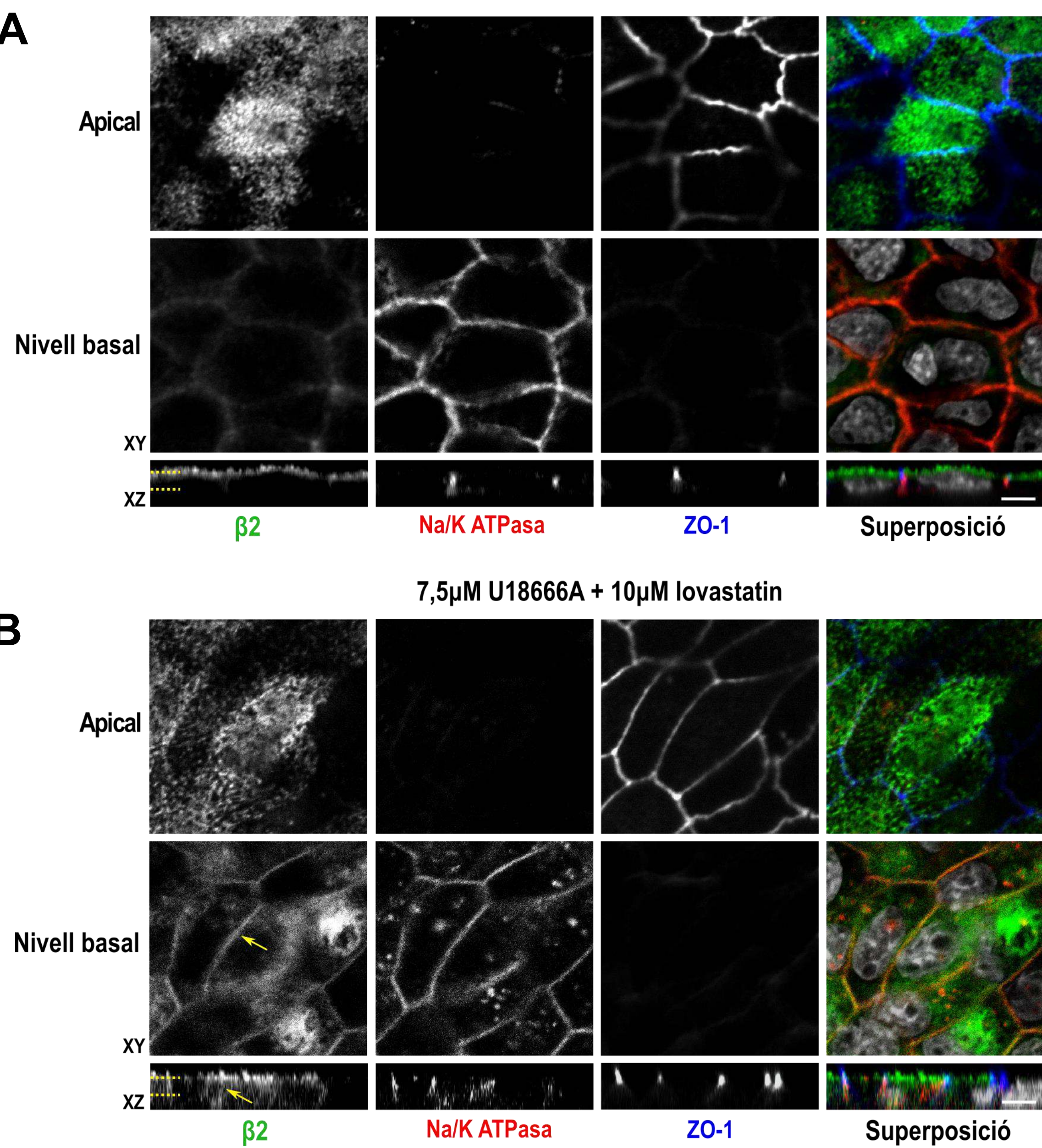
RESULTATS

1. $\beta 2$ es localitza al domini apical de cèl·lules MDCK



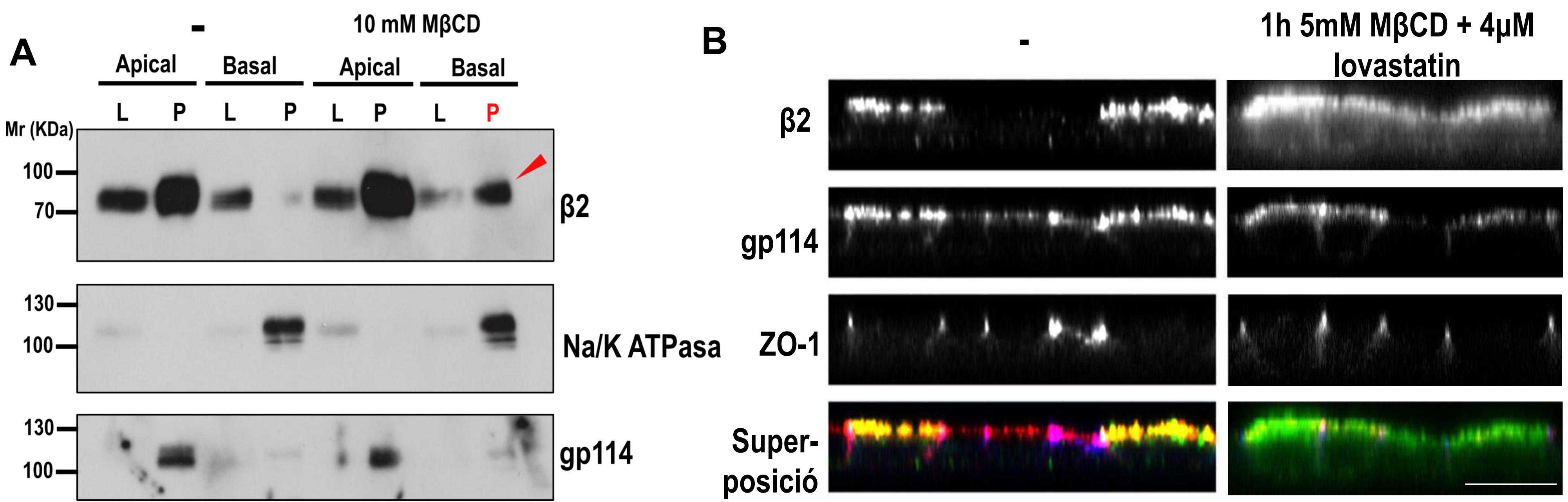
Cèl·lules MDCK es van transfectar per expressar $\beta 2$ -CFP i es van fer créixer polaritzades en Transwells. Llavors es van processar per immunofluorescència. Imatges confocals XY i reconstruccions XZ mostren $\beta 2$ (verd) majoritàriament al domini apical. Fal·loïdina (vermell) marca el citoesquelet d'actina, resseguint la membrana plasmàtica. Els nuclis es van tenyir amb DAPI (blau). Barra d'escala: 10 μm .

3. La inhibició del transport intracel·lular de colesterol deslocalitza $\beta 2$ al domini basal



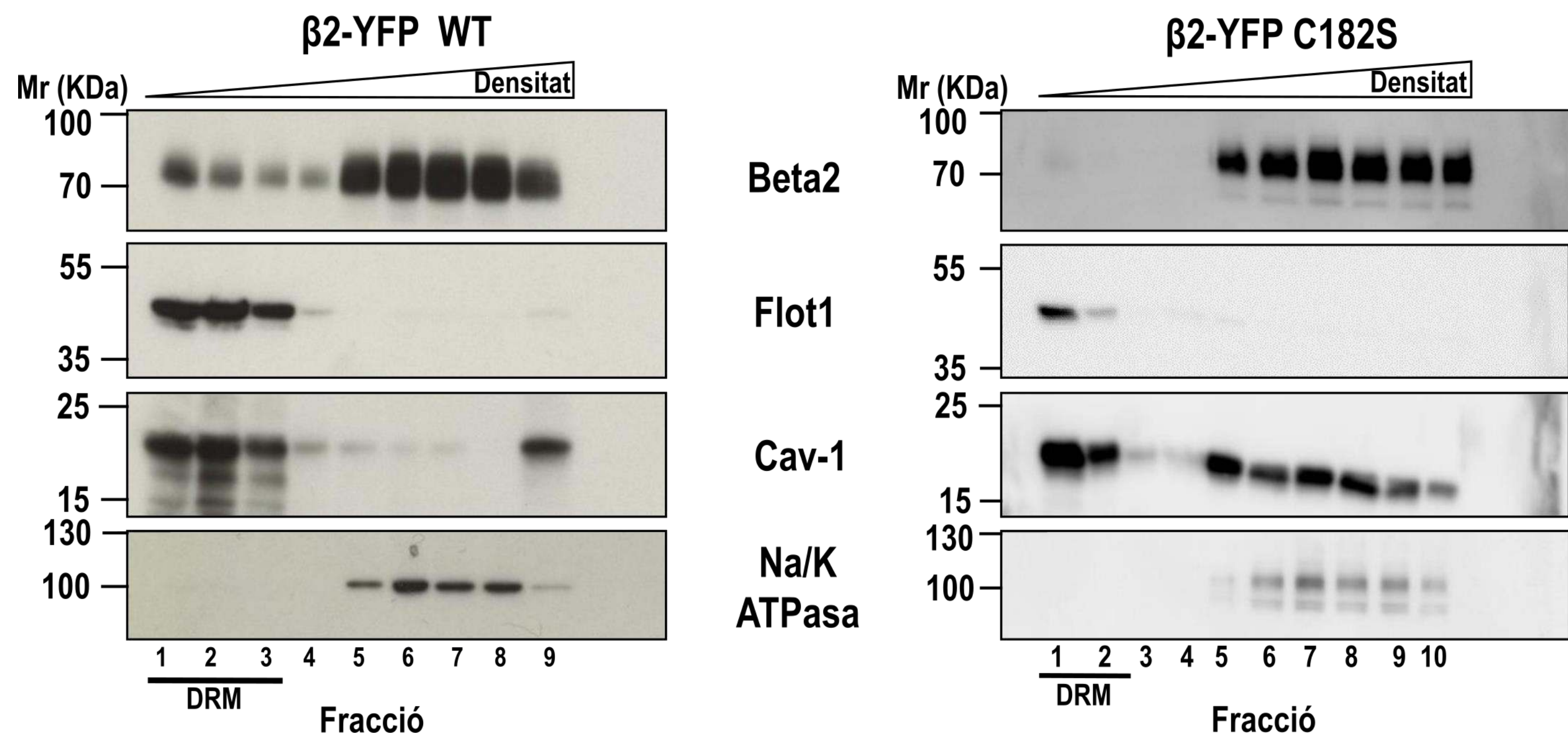
Cèl·lules MDCK amb expressió estable de $\beta 2$ -YFP es van fer créixer polaritzades en Transwells. Llavors es van tractar amb U18666A i lovastatin durant 24h (B) o es van deixar sense tractar (A). Després es van processar per immunofluorescència. Imatges confocals XY i reconstruccions XZ mostren $\beta 2$ (verd) al domini apical (A) en cèl·lules sense tractar o deslocalitzada a nivell basal en cèl·lules tractades (B, fletxes grogues). La correcta distribució de ZO-1 (unions estretes, blau) i Na/K ATPasa (basal, vermell) demostra la polaritat intacte de les cèl·lules tot i el tractament. Els nuclis es van tenyir amb DAPI (gris). Barra d'escala: 10 μm .

2. La reducció de colesterol de membrana deslocalitza $\beta 2$ al domini basal



Cèl·lules MDCK es van transfectar per expressar $\beta 2$ -YFP i es van fer créixer polaritzades en Transwells. Llavors, es van tractar amb MβCD (A), o també amb lovastatin (B) durant 1h. A. Es van analitzar les proteïnes dels dominis apicals i basolateral per biotinilació a 4°C. Western blot mostra la presència de $\beta 2$ al domini basal només en les cèl·lules tractades (punta de fletxa vermella). La correcta distribució de gp114 (apical) i Na/K ATPasa (basal) demostra la polaritat intacte de les cel·lules tot i el tractament. L: llistat cel·lular total (10%). P: *pulldown* (proteïnes biotinilades, extreïdes del llistat restant, ~90%). Mr: Massa relativa en kilodaltons (kDa). B. Les cèl·lules es van processar per immunofluorescència. Reconstruccions XZ d'imatges confocals mostren $\beta 2$ (verd) al domini basolateral només en presència del tractament. La detecció de gp114 (vermell) apical i ZO-1 (blau) a unions estretes mostra la correcta polarització de les cèl·lules tot i el tractament. Barra d'escala: 10 μm .

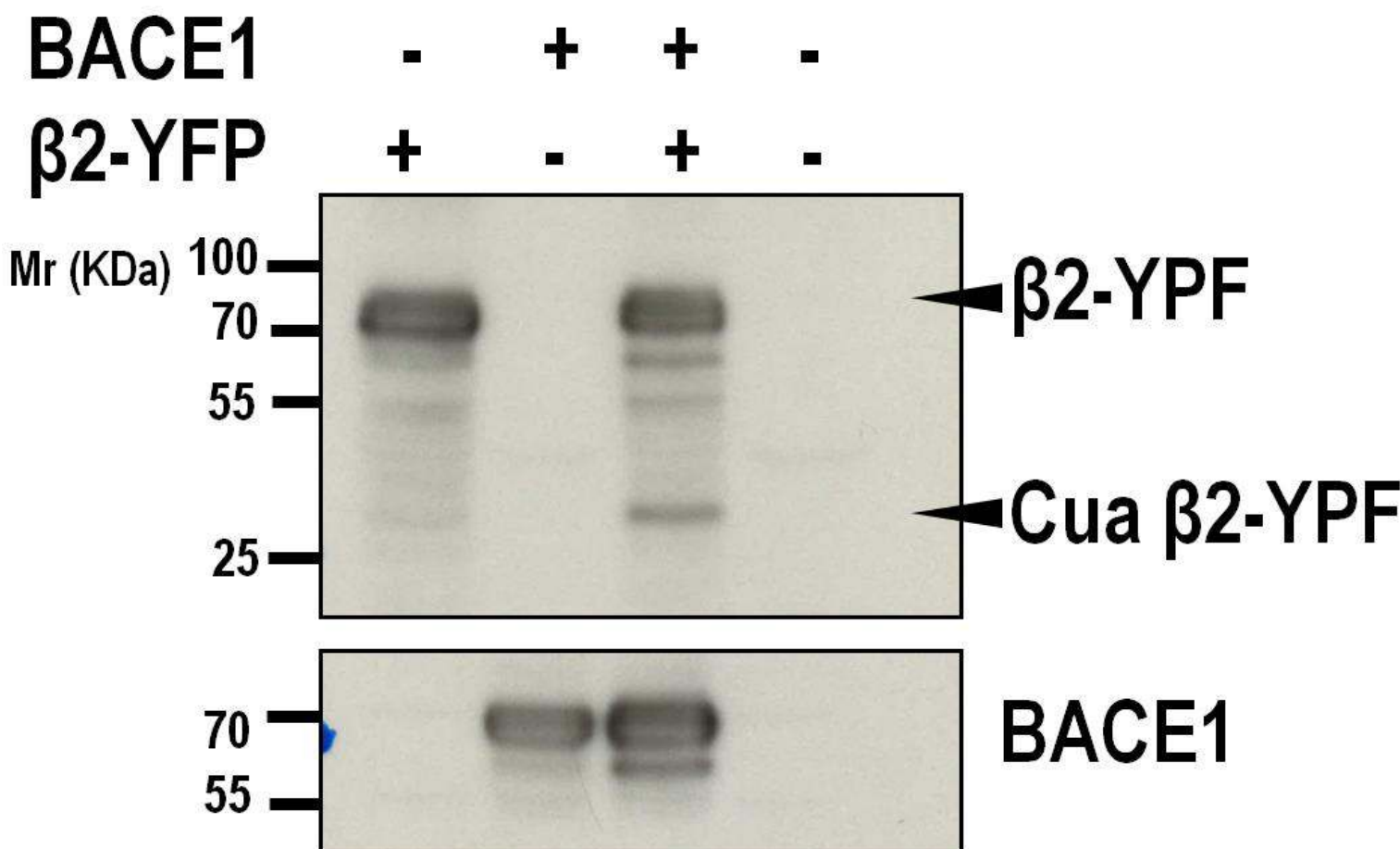
4. La palmitoïl·lació distribueix $\beta 2$ a *lipid rafts*



Aïllament de *lipid rafts* de cèl·lules MDCK amb expressió estable de $\beta 2$ -YFP WT o C182S. Els blots mostren la major part de $\beta 2$ en fraccions no *raft*. Una part minoritària de $\beta 2$ WT, però no de $\beta 2$ -YFP C182S, també es localitza en fraccions *raft* (DRM). Flot1 i cav-1 (DRM) i Na/K ATPasa (No DRM) mostren un correcte fraccionament d'aquests dominis de membrana. Mr: Massa relativa en kilodaltons (kDa).

5. BACE1 escindeix $\beta 2$ en cèl·lules MDCK

$\beta 2$ és clivada de manera seqüencial per BACE1 i γ -secretases, alliberant els dominis extracel·lular i intracel·lular respectivament. Les cèl·lules MDCK expressen γ -secretases però no BACE1 de manera significativa. L'expressió exògena de BACE1 permet el clivatge també per γ -secretases.



Cèl·lules MDCK es van transfectar per expressar $\beta 2$ -YFP, BACE1 o es van deixar sense transfectar (-). Posteriorment es van lissar i analitzar per western blot. El blot mostra com en presència de BACE1, $\beta 2$ és clivada, alliberant el fragment intracel·lular, fusionat a YFP. Mr: Massa relativa en kilodaltons (kDa).

Finançament



Institucions

