

Identificación de proteínas que interaccionan con la subunidad catalítica de la fosfatasa 2A en condrocitos artrósicos y normales

Lires M, López Armada M, Cillero B, Mateos J, Lema B, Blanco FJ.

Laboratorio de Investigación Osteoarticular y del Envejecimiento. Centro de Investigación Biomédica. CHU Juan Canalejo. La Coruña.

Introducción

La fosfatasa 2A (PP2A) es una serín /treonín fosfatasa ubicua implicada en la regulación de múltiples rutas de señalización celular, algunas de ellas directamente relacionadas con la patología artrósica (OA), como son la proliferación y la muerte celular por apoptosis. El cartílago artrósico se caracteriza por poseer una población celular disminuída, como consecuencia de una menor proliferación y a un aumento del grado de apoptosis, por lo que estos y otros eventos celulares característicos de la OA podrían ser consecuencia de un distinto patrón de interacción de la PP2A con otras proteínas. El objetivo de este trabajo fue identificar y comparar el patrón de proteínas que interaccionan con la PP2A a través de su subunidad catalítica (PP2Ac) en condrocitos normales y OA en cultivo.

Material y métodos

Los condrocitos humanos se aislaron de cartílago, bien obtenido de autopsias de donantes sin historial de enfermedad (condrocitos normales), o bien a partir de pacientes artrósicos sometidos a cirugía sustitutiva (condrocitos OA). Las células son mantenidas en cultivo hasta alcanzar la confluencia, momento en el cual se lisan para obtener los extractos de proteína totales. Por otro lado, para sobreexpresar la proteínas de fusión GST-PP2Ac, el fragmento de cDNA que codifica la PP2Ac fue subclonado en el sitio BamHI y EcoRI del vector pGEX-6P. El plásmido recombinante fue transformado en la cepa BL21 de *E. coli*, y la expresión de GST-PP2Ac fue inducida con 1mM de isopropyl β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a 37°C durante 6h. Las bacterias fueron lisadas mediante sonicación en buffer de lisis. El sobrenadante fue incubado con *gluthatione-sepharose* (GE Healthcare). Posteriormente, *las beads* fueron lavadas, e incubadas con los lisados celulares procedentes de condrocitos OA y normales, para realizar los

ensayos de unión *in vitro* y aislamiento por GST-pulldown. Un pool de cuatro donantes se realizó por cada condición por duplicado y se resolvió por 2-DE según el protocolo previamente descrito por nuestro grupo (Ruiz et al; 2005). Las manchas se visualizaron con Sypro. Los análisis cuantitativos y cualitativos se hicieron con el PD-QUEST software. Las proteínas se identificaron por espectrometría de masas usando tecnología MALDI-TOF/TOF.

Resultados

El número de manchas visualizado fue 67, de los cuales se consiguieron identificar 35. No se observaron diferencias cualitativas entre OA y normales, pero sí se observaron diferencias cuantitativas (6), de las cuales se lograron identificar, por el momento, dos de ellos, que resultaron ser las subunidades A y B de la ATP sintetasa. El análisis cuantitativo mostró unos valores de interacción con la subunidad catalítica de la fosfatasa 2A de 0.39 para la subunidad A (OA vs 1.00 en normales) y de 0.48 para la subunidad B.

Conclusiones

El patrón de proteínas que interaccionan con la PP2A es diferente en condrocitos normales y artrósicos. Existe una menor interacción *in vitro* de la PP2A con la ATP sintetasa en los condrocitos artrósicos. Es necesario realizar estudios que confirmen estas interacciones *in vivo* para valorar su posible significado fisiológico.

Bibliografía

- Van Hoof C, Goris J. *Biochim Biophys Acta*. 2003; 1640: 97-104.
- Wong-Jeong Lee, Dong-Uk Kim, Mi-Young Lee, Kang-Yell Choi. 2007. *Proteomics*, 206-214.