

Estabilidad e interacciones del dominio de unión del receptor de LDL



Trabajo fin de Máster

Máster Biología Molecular y Celular

Autor: Zuriñe Rozado Aguirre

Director: Javier Sancho Sanz

Estabilidad e interacciones del dominio de unión del receptor de LDL

Resumen del proyecto

El receptor de lipoproteínas de baja densidad (rLDL) es una proteína de membrana que juega un papel crucial en el mantenimiento de concentraciones adecuadas de colesterol en el organismo. Su disfunción se asocia con la aparición de Hipercolesterolemia Familiar (HF), una enfermedad común caracterizada por altos niveles de colesterol en los vasos sanguíneos. El mecanismo por el cual el receptor lleva a cabo la internalización de las lipoproteínas a las células y su posterior liberación en los endosomas sigue siendo hoy en día de gran interés para entender en segundo lugar disfunciones del receptor asociadas a HF.

Entre los distintos dominios del receptor, se encuentra el dominio de unión a ligando, compuesto a su vez por 7 repeticiones homólogas de unos 40 aminoácidos, conocidas como módulos LR (1-7) de los cuales los números 4 y 5 son los directamente implicados en la unión con las lipoproteínas. Todos ellos requieren la presencia de Ca^{2+} para adoptar una conformación estable y mantener a las LDL unidas. En este trabajo se expone un estudio de las propiedades del módulo 4 y el tándem 4-5 con objeto de estudiar sus diferencias conformacionales en presencia y ausencia de Ca^{2+} y Mg^{2+} tanto en condiciones extracelulares (pH 7) como endosomales (pH 5.5), donde se produce la liberación.

Entre los estudios llevados a cabo en este trabajo, se encuentran en su mayoría ensayos cinéticos de asociación y disociación, realizado mediante el sistema de flujo detenido, de los módulos LR4 y LR5 con Ca^{2+} y Mg^{2+} en ambas condiciones que en algunos casos se complementan con otras técnicas termodinámicas. Por otro lado, en el trabajo se lleva a cabo la purificación y una caracterización espectroscópica preliminar del dominio de unión a ligando completo LR (1-7)

Estabilidad e interacciones del dominio de unión del receptor de LDL

Estabilidad e interacciones del dominio de unión del receptor de LDL

3.1.2.2.1.	Ensayos de fluorescencia	18
3.1.2.2.2.	Ensayos de calorimetría isoterma de titulación	19
3.2.	Purificación y caracterización de LR 1-7	21
3.2.1.	Expresión y purificación de LR 1-7	21
3.2.1.1.	Expresión y transformación en células competentes	21
3.2.1.2.	Crecimiento en placa y cultivo	21
3.2.1.3.	Filtración, concentración y diálisis	21
3.2.1.4.	Cromatografía de hidroxapatito	22
3.2.1.5.	Diálisis redox	22
3.2.1.6.	Cromatografía de exclusión molecular	22
3.2.1.7.	Electroforesis SDS-PAGE	22
3.2.2.	Caracterización de LR 1-7	23
3.2.2.1.	Espectrometría de masas	23
3.2.2.2.	Caracterización espectroscópica	23
3.2.2.3.	Desnaturalización térmica	24
4.	CAPÍTULO 4: Resultados	25
4.1.	Interacción de LR4, LR5 y LR4-5 con Ca ²⁺ y Mg ²⁺	25
4.1.1.	LR5	25
4.1.2.	LR4	34
4.1.3.	LR4-5	39
4.2.	Purificación y caracterización de LR 1-7	44
4.2.1.	Purificación de LR 1-7	44
4.2.2.	Caracterización de LR 1-7	45
4.2.2.1.	Espectrometría de masas	45
4.2.2.2.	Caracterización espectroscópica	46
4.2.2.3.	Desnaturalización térmica	47
5.	CAPÍTULO 5: Discusión	49
5.1.	Unión de cationes a LR4, LR5 y LR4-5	49
5.1.1.	LR5	49
5.1.2.	LR4	50

5.1.3. LR 4-5	51
5.2. Purificación y caracterización de LR 1-7	52
6. CAPÍTULO 6: Conclusiones	53
7. CAPÍTULO 7: Bibliografía	55
ANEXO I: Secuencias y propiedades de LR4, LR5, LR4-5 y LR 1-7	
ANEXO II: Medios de cultivo	

Estabilidad e interacciones del dominio de unión del receptor de LDL

CAPÍTULO 1

Introducción y antecedentes

1.1 Las lipoproteínas y el colesterol

El colesterol es un lípido hidrofóbico de fórmula $C_{27}H_{46}O$ esencial para el mantenimiento de la estructura de las membranas celulares y precursor de moléculas importantes como las hormonas sexuales y ácidos biliares entre otros. Está compuesto por 4 anillos seguidos de una cola hidrofóbica, siendo un grupo hidroxilo en la posición 3 su único componente polar (figura 1.1). Debido a este motivo, el transporte del colesterol no se realiza de forma soluble por el plasma sino unido a otros componentes como proteínas y lípidos formando de esta manera grandes complejos conocidos como lipoproteínas. Se conocen diferentes tipos de lipoproteínas según el porcentaje de sus distintos componentes (VLDL, LDL, IDL, HDL). Entre ellas destacan las LDL (*low density lipoprotein*), que presentan un alto contenido de colesterol y ésteres de colesterol. Éstas transportan el colesterol hacia tejidos o músculos con alta demanda donde el lípido es internalizado a través de endocitosis mediada por receptor. Por otro lado cabe destacar también el papel que juegan las HDL (*high density lipoprotein*), bajas en colesterol y que participan el transporte reverso del mismo.

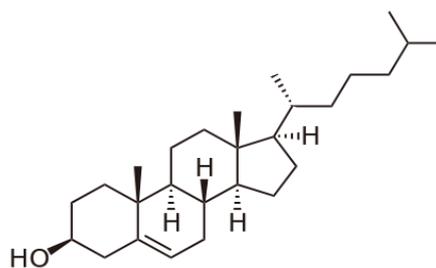


Figura 1.1: Estructura del colesterol con el grupo OH en la posición 3.

Existen dos vías que garantizan la disponibilidad del colesterol en el interior de las células. Una de ellas es la vía endógena, mediante la cual el colesterol es sintetizado a partir de acetil-CoA gracias a la acción de múltiples enzimas intracelulares entre las que destaca la HMG-CoA reductasa como limitante del proceso^[1]. Por otro lado se encuentra la vía exógena en la que el colesterol es incorporado al interior del organismo a partir de la dieta. Es de esta forma cuando el colesterol se transporta por la circulación como lipoproteínas y es incorporado al interior de las células por medio de un receptor específico.

1.2 El receptor de lipoproteínas de baja densidad e Hipercolesterolemia Familiar (HF)

El receptor de lipoproteínas de baja densidad (rLDL), es un receptor transmembrana encargado de la homeostasis del colesterol en el organismo al facilitar la internalización de las lipoproteínas al interior celular^[2]. Su identificación se produjo gracias a las investigaciones realizadas por Joseph Goldstein y Michael Brown, lo que les valió el Premio Nobel en 1985^[3]. Es miembro fundador de la familia de receptores con el mismo nombre en la que se encuentran el receptor de VLDL, LRP1, LRP2, apo-ER2^[4]. Entre sus ligandos naturales se encuentran las LDL y VLDL^[5], consideradas como lipoproteínas pro-aterogénicas^[6] y con las que interacciona a través de sus apoE y apoB.

El mal funcionamiento del receptor se asocia con la aparición de Hipercolesterolemia Familiar (HF)^[7,8], una enfermedad autosómica dominante que se caracteriza por la acumulación del colesterol en los vasos sanguíneos. La incidencia es de 1/500 personas en la forma heterocigótica, llegando los pacientes a triplicar los niveles normales de colesterol en sangre y presentando riesgos de padecer enfermedades coronarias^[9]. Además, la HF homocigótica, de incidencia mucho menor, se presenta de forma más agresiva y los pacientes sufren síntomas desde la niñez^[9].

1.2.1 El gen del rLDL

El gen del receptor se ubica en el brazo corto del cromosoma 19 con una longitud de 45000 pares de bases. Su estructura puede observarse en la figura 1.2. Contiene 18 exones que dan lugar a los diferentes dominios del receptor y de los cuales la mayoría de ellos ya han sido descritos a nivel de proteína en otras estructuras^[10].

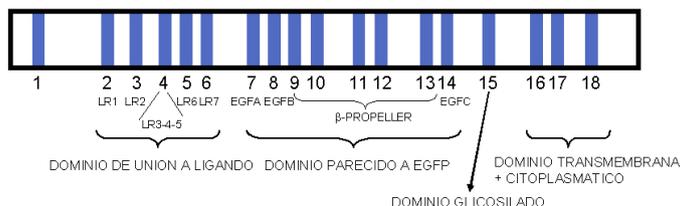


Figura 1.2: Representación de la estructura del gen del r-LDL con los 18 exones repartidos en los distintos dominios estructurales del receptor. El exón 1 da lugar al péptido señal.

Se han encontrado diversas mutaciones en el gen del receptor que derivan en fallos en la funcionalidad del mismo, correspondiendo la mayoría de ellas a sustituciones (73.3%) y deleciones (19.6%). Muchas de ellas se encuentran en el dominio de unión a ligando, por lo que el estudio y caracterización de este dominio resulta de vital importancia para el entendimiento de enfermedades coronarias que cursan con la acumulación del colesterol en el organismo.

1.2.2 Estructura del r-LDL

El r-LDL se compone de 839 aminoácidos que se reparten estructuralmente en cinco dominios independientes^[11]: el dominio de unión a ligando, dominio homólogo al precursor del factor de crecimiento epidérmico (EGFP), glicosilado, transmembrana y citoplasmático. La distribución de todos ellos puede observarse en la siguiente figura:

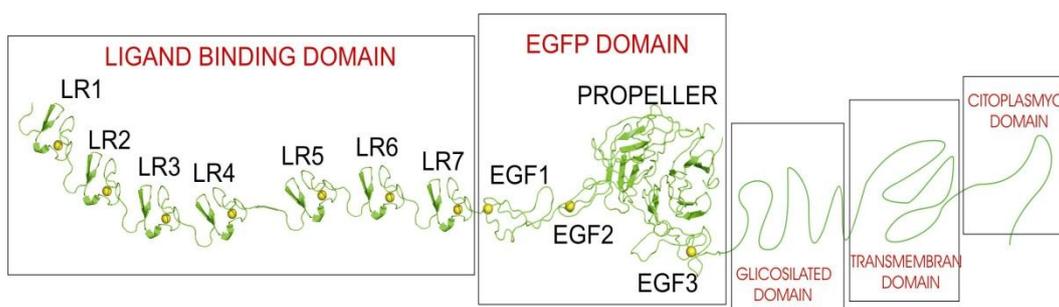


Figura 1.3: Distribución de los cinco dominios del receptor LDL, de izquierda a derecha (PDB: 1N7D); Dominio de unión a ligando, homólogo al precursor del factor de crecimiento epidérmico, glicosilado, transmembrana y citoplasmático.

- **Dominio de unión a ligando (LBD)**

Se compone de 292 aminoácidos distribuidos en siete unidades estructuralmente homólogas conocidas como módulos LR (LR 1-7), siendo el número 1 el más próximo al extremo N-terminal. Cada uno de ellos está compuesto de unos 40 aminoácidos, seis cisteínas conservadas que dan lugar a tres puentes disulfuro y presentan también un centro de coordinación con el Ca^{2+} ^[12,13] (Anexo I).

Estabilidad e interacciones del dominio de unión del receptor de LDL

```
LR1  --DRCE-RNEFQCQD--GKCI SYKWC DGS AECQDGSDESQETCLS
LR2  --VTCK-SGDFSCGGRVNRCI PQFWRCDGQVDCDNGSDEQG--CPP
LR3  --KTCS-QDEFRCHD--GKCI SRQFVCDSDRDCLDGSDEAS--CPV
LR4  --LTCG-PASFQCNS--STCI PQLWACDNDPDCEDGSDEWFPQRCRG
LR5  DSSPCS-AFEFHCLS--GECIHSSWRCDGGPDCKDKSDEEN--CA-
LDLR6 -VATCR-PDEFQCSD--GNCIHGSRQCDREYDCKDMSDEVG--CVN
LDLR7 -VTLCEGPNKFKCHS--GECITLDKVCNMARDCRDWSDEPIKEC--
```

Figura 1.4: Alineamientos de secuencias correspondientes a los módulos LR. En rojo, las 6 cisteínas que forman los puentes disulfuro, residuos ácidos en azul y en verde residuos hidrofóbicos conservados.

Se ha demostrado que entre todos ellos, los número 4 y 5 se encuentran directamente implicados en la unión y liberación de las lipoproteínas^[14], además, entre ellos existe un puente de diez aminoácidos que no se encuentra presente en el resto de módulo.

Se ha comprobado que el Ca^{2+} es necesario para la formación de los puentes disulfuro nativos en el plegamiento de la proteína en el retículo endoplasmático^[15]. Una vez plegadas, los módulos LR pueden adoptar una conformación nativa coordinándose con Ca^{2+} u otra configuración que no une Ca^{2+} . Parece ser, aunque no está del todo comprobado, que la forma unida a Ca^{2+} es la única capaz de unir a las LDL^[16].

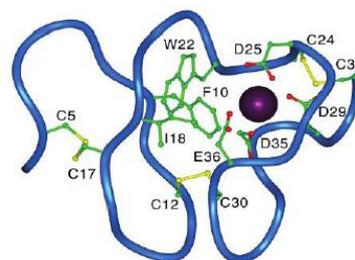


Figura 1.5: Estructura de LR5 con el átomo de Ca^{2+} coordinado (morado) de forma directa por residuos ácidos^[17] y los puentes disulfuro en amarillo.

▪ Dominio homólogo a EGFP

Compuesto por unos 400 aminoácidos, constituye el dominio más grande del receptor^[18]. Empezando por su extremo N-terminal se compone de dos módulos pequeños parecidos al factor de crecimiento epidérmico (EGF_A y EGF_B), un dominio conocido como YWTD (Tyr-Trp-Tre-Asp) o β -propeller, y un último módulo similar al EGF (EGF_C).

Los módulos parecidos a EGF se componen de 40 aminoácidos, incluyendo seis cisteínas que forman tres puentes disulfuro, y además, son capaces de unir Ca^{2+} lo que les hace asemejarse a los módulos LR^[19]. El motivo β -propeller o turbina β está compuesto por seis repeticiones YWTD que forman seis láminas β y se encuentra siempre presente en todos los miembros de esta familia de receptores^[20]. Su función principal está asociada a la liberación de

las LDL cuando éstas se encuentran en el endosoma y se encuentra también estrechamente relacionado con la aparición de HF^[21].

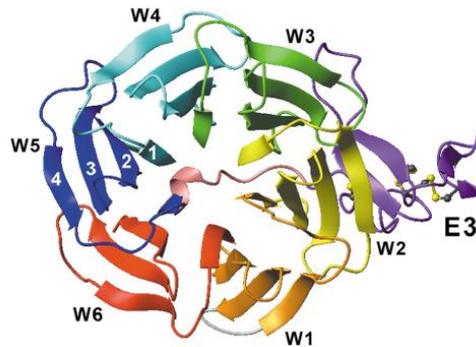


Figura 1.6 Estructura del dominio β -propeller dividido en 6 hojas β antiparalelas tetracatenarias.

- **Dominio glicosilado**

Dominio rico en aminoácidos de serina y treonina que sufren glicosilaciones en el aparato de Golgi^[10,22]. Es un dominio pequeño de unos 50 aminoácidos, que no se encuentra en todos los receptores de esta familia. Su función no está del todo definida aunque se piensa que puede actuar como soporte para el resto del dominio extracelular o como protección en el proceso de reciclaje del receptor a la membrana.

- **Dominio transmembrana**

Dominio hidrofóbico de unos 40 aminoácidos que interactúan con las cadenas apolares de los fosfolípidos presentes en la bicapa lipídica

- **Dominio citoplasmático**

Compuesto por 50 residuos, su función se relaciona con la endocitosis e internalización de las LDL al interior celular. Esto se debe a la presencia de una secuencia de reconocimiento para una proteína que interactúa con las moléculas de clatrina que forman las vesículas de endocitosis. Este hecho se ha comprobado mediante mutagénesis dirigida en esta secuencia que daba lugar a la incapacidad de internalizar las LDL en las células^[23].

1.3 Ruta de internalización y liberación de LDLs.

El r-LDL es sintetizado en el retículo endoplasmático (RE) como una proteína inmadura de 120kDa. A continuación pasa al aparato de Golgi donde sufre ciertas glicosilaciones en algunos de sus aminoácidos aumentando su masa molecular hasta 160 kDa. Existen

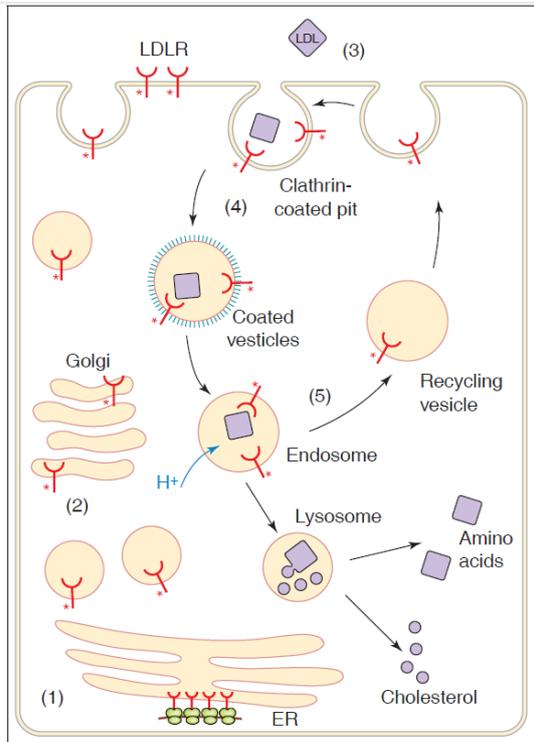


Figura 1.7: Ciclo de internalización y liberación de las LDL por parte del rLDL.

endosomas^[28]. Estos cambios de condiciones conllevan una alteración de la estructura del rLDL que provoca la disociación de las lipoproteínas. El proceso finaliza con la degradación de las LDL en sus componentes básicos y reciclaje del receptor a la membrana celular a la espera de comenzar un nuevo ciclo^[24] (figura 1.7).

El modelo canónico de disociación de las lipoproteínas del receptor postula que en condiciones endosomales (pH 5.5), la afinidad del dominio β -propeller por los módulos 4 y 5 del dominio de unión a ligando unidos a las LDL es notablemente mayor que en condiciones extracelulares^[29]. Se produce entonces la formación de un

chaperonas en el RE como en Golgi que aseguran su correcto plegamiento y evitan su agregación^[24,25]. Por último, es transportado en el interior de vesículas hasta la membrana plasmática a la espera de realizar su función biológica.

El ciclo de internalización comienza con la unión en la cara externa de la membrana celular de la parte apo de las LDL al receptor. Una vez producida la unión, el complejo es endocitado al interior mediante la formación de vesículas recubiertas de clatrina^[8,26]. Las condiciones de estas vesículas se ven rápidamente afectadas, dando lugar a una pérdida masiva de iones Ca^{2+} al exterior^[27] y una acidificación de las mismas hasta pH 5.5 recibiendo el nombre de

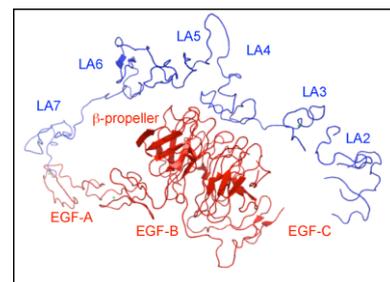


Figura 1.8: Estructura cristalográfica obtenida en la que se ve la asociación entre los dos dominios del receptor.

complejo entre ambos dominios que provoca el desplazamiento de las lipoproteínas^[30]. Este modelo se postuló en base a la estructura cristalográfica obtenida a pH endosomal en la que se observaba la asociación entre los dos dominios del receptor^[30] (figura 1.8). Sin embargo el ensayo cristalográfico se realizó a altas concentraciones de Ca^{2+} que no se encuentran en el endosoma^[28]. La concentración del catión se ve notablemente disminuida en el interior como consecuencia de la apertura de canales que bombean el catión al exterior.

Los trabajos realizados por el Dr. Arias Moreno en nuestro grupo de investigación con el módulo LR5 sugirieron la posibilidad de un mecanismo de liberación alternativo por parte del receptor^[31,32]. Se basa en un mecanismo secuencial en el que la bajada de pH y la pérdida de Ca^{2+} en el endosoma conducen a un aumento de inestabilidad del módulo, que pierde su estructura y conduce a la liberación de las LDL. Este modelo por tanto, no postula la asociación con el dominio β -propeller como causa única de liberación de las LDL, aunque no se descarta la asociación una vez producida la liberación de las LDL (figura 1.9).

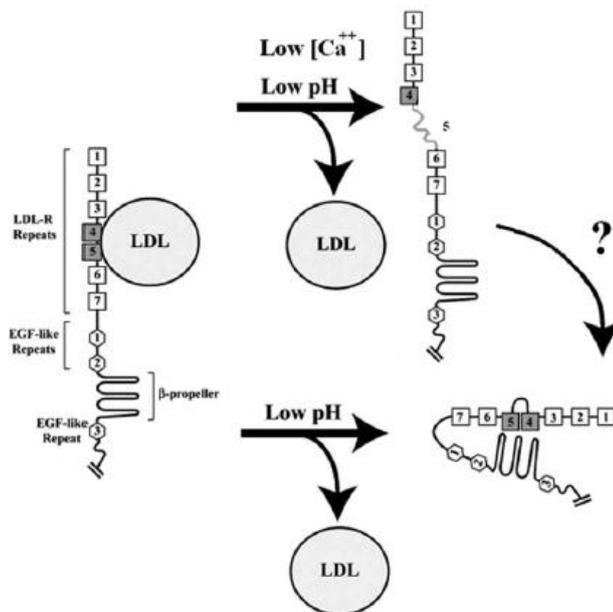


Figura 1.9. (Arriba) Mecanismo de liberación de las LDL que postula la baja concentración de Ca^{2+} y disminución de pH favorecen la disociación de las LDL. (Abajo), mecanismo canónico de liberación que refleja la asociación entre dominios como motivo de la liberación.

Los ensayos también indicaron que el ion Mg^{2+} presente en el endosoma en una concentración similar a la del medio extracelular podría tener importancia en el proceso de repliegamiento del módulo una vez liberadas las LDL^[33], lo que favorecería a continuación, la formación del autocomplejo con el β -propeller.

1.4. Antecedentes

En los años previos a este proyecto se ha realizado en el grupo una larga y exhaustiva caracterización de los módulos LR4 y LR5 directamente implicados en la unión a las LDL, trabajo realizado primero por Xabier Arias-Moreno y a continuación por Juan Martínez. Los ensayos se realizaron tanto a pH extracelular (pH 7) como endosomal (pH 5.5), observando las diferencias estructurales que los módulos presentan en cada una de las situaciones.

1.4.1. Estudio conformacional y funcional del LR5

El trabajo comienza con la elaboración de un protocolo de obtención y purificación para LR5, que se ha extendido al resto de construcciones empleadas (LR4 y LR4-5). En este protocolo la proteína se obtiene fusionada a GST^[31] (glutación sulfhidril-transferasa). Tras la obtención en primer lugar de LR5, se realizó una completa caracterización por técnicas tanto espectroscópicas como calorimétricas que reflejaban la importancia del ion Ca^{2+} en el mantenimiento de la conformación funcional del módulo, y la inestabilidad que éste último presenta en condiciones endosomales^[32]. Todo ello llevó a postular un mecanismo alternativo de liberación de las LDL en el interior del endosoma basado en la bajada de pH y la pérdida de Calcio como agentes causantes de la disociación^[32].

De la misma forma, más adelante se realizaron ensayos cinéticos en condiciones extracelulares del LR5 mediante la técnica de flujo detenido, Stopped-flow, midiendo la afinidad del ion Ca^{2+} por el módulo.

1.4.2 Estudio conformacional y funcional del LR4 y LR4-5

Analizado el comportamiento y estructura del LR5, se procedió a la caracterización de LR4 y el tándem LR4-5. Los resultados indicaron que todos ellos son capaces de coordinarse con el Ca^{2+} de una manera similar a como lo hace LR5, reflejando de la misma forma la importancia de la coordinación en el mantenimiento de su estructura. Todos estos datos se superponían con los obtenidos para LR5, manteniéndose compatible el nuevo modelo de liberación explicando que además del módulo LR5, el resto de ellos podían presentar un comportamiento similar.

CAPÍTULO 2

Objetivos

El objetivo a largo plazo de este proyecto consiste en conocer el papel que los módulos del dominio de unión a ligando, y más en concreto LR4 y LR5, juegan en el proceso de internalización y liberación de las LDL. Para conseguirlo y atendiendo a los datos anteriormente descritos, se definen en este trabajo una serie de objetivos específicos:

1. Analizar exhaustivamente la cinética de unión de los módulos LR4, LR5 y LR45 con Ca^{2+} y Mg^{2+} .

- Medir la estabilidad y fortaleza de unión entre los cationes y los módulos LR4, y LR4-5.

2. Purificar y caracterizar el dominio de unión a ligando completo LR (1-7).

CAPÍTULO 3

Materiales y métodos

3.1. Trabajo con LR4, LR5 y LR45

3.1.1. Expresión y purificación de LR4, LR5 y LR45

3.1.1.1 Transformación en células competentes y crecimiento en placa

Todas las construcciones fueron clonadas por Xabier Arias-Moreno en el plásmido de expresión pGEX-4T-3 unidas a glutatión sulfhidril-transferasa (GST)^[32]. Entre lo más destacable de este plásmido se encuentra el gen para la expresión de GST seguido de la secuencia de corte para trombina, el gen de resistencia a ampicilina con el fin de seleccionar las colonias que han incorporado el plásmido, y el promotor inducible con IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) para conseguir sobreexpresión de la proteína.

El proceso de introducción del plásmido en células de *Escherichia coli* BL21 se realiza mediante la transformación por choque térmico. Se añaden en hielo y en condiciones de esterilidad 5 μ l de plásmido a una concentración de 100 ng/ μ l, y 90 μ l de células BL21 y se incuba la mezcla 15 minutos en hielo. Seguidamente, se incuba durante 50 segundos en baño seco a 42 °C y de nuevo se introduce en hielo 2 minutos. Pasado este tiempo se añaden 900 μ L de LB fresco y se deja crecer a 37 °C durante unas 2 horas con agitación. Finalmente se siembran 200 μ l en una placa de LB-agar con ampicilina y se incuba durante 16-20 horas. El control negativo se realiza, tratando en paralelo, una muestra de células competentes a las que se adiciona agua milli-Q estéril en lugar de plásmido.

3.1.1.2. Cultivo a gran escala

Seleccionadas las colonias, se procede al cultivo a gran escala que permita obtener gran cantidad de proteína. En este caso el escalado tiene lugar a 10 L de cultivo por cada proteína de interés.

En primer lugar y en condiciones de esterilidad, se pica una colonia de la placa crecida con una punta de micropipeta y se vierte en un falcon con 10 ml de medio LB y una concentración de ampicilina de 100 µg/ml. Este proceso se repite por litro de cultivo y cada falcon se deja crecer a 37 °C con agitación (180 rpm) hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 U.A a 600 nm. Una vez crecidas, el contenido de cada falcon se trasvasa a un erlenmeyer autoclavado de 2 L que contiene 1 L de medio LB y una concentración de ampicilina de 100 µg/ml. Nuevamente se dejan crecer en las mismas condiciones hasta alcanzar la densidad óptica requerida (0.6 U.A), momento en el que tiene lugar la inducción con IPTG. Los cultivos se recogen pasadas 12-16 horas centrifugando durante 10 minutos a 9000 rpm en el rotor JA-10 de la centrifuga Avanti J-25 (*BeckmanCoulter*) y se recoge el sedimento para continuar con el siguiente paso de purificación.

3.1.1.3. Ultrasonación de células

El sedimento recogido se resuspende en Tris 50 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 2 mM pH 8.0 y se procede a la rotura de las células mediante ultrasonidos. La disolución se somete a 7 ciclos de ultrasonidos en el aparato UP 200 (figura 3.1). Se realizan 5 ciclos de 45 segundos separados por 30 segundos a 0.8 de potencia y 0.5 de pulso y 2 ciclos de 30 segundos a 0.8 de potencia y 1 de pulso. La disolución se mantiene en hielo para evitar el sobrecalentamiento de la misma. El siguiente paso requiere la centrifugación durante 25 min a 22500 rpm en el rotor JA-25.50 de la centrifuga Avanti J-25 (*Beckman Coulter*).



Figura 3.1: Ultrasonador UP-200 utilizado para la rotura de las células recogidas.

3.1.1.4. Purificación mediante cromatografía de afinidad (FPLC)

El sobrenadante obtenido tras la centrifugación se pasa por una columna GSTPrep FF16/10 (*GE-Healthcare*) de afinidad a glutation conectada a una bomba peristáltica Pump P-1 (*GE Healthcare*). La columna se equilibra previo paso a la muestra con 5 volúmenes de columna de tampón Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 8 (tampón de carga) con un flujo de 5 ml/min. La muestra se carga a un flujo de 2 ml/min con objeto de conseguir una mayor interacción con la columna. A continuación, se realiza el lavado de la columna con el tampón de carga con el fin de eliminar las interacciones inespecíficas, hasta conseguir una absorbancia en el UV-visible menor que 0.05 U.A (250-300 ml aproximadamente). Finalmente se procede a la elución de la proteína retenida con un tampón con alto contenido en glutation que compite por los sitios de unión a la columna, compuesto por Tris 50 mM, NaCl 150 mM, Glutacion 10 mM, pH 8.0 (5 ml/min).

3.1.1.5. Corte con trombina y diálisis redox.

La separación de la proteína de fusión se realiza con Trombina (*Sigma*), proteasa de origen bovino que se añade a la muestra cuantificada a una concentración de 1 U/mg proteína de fusión. Para conseguir una buena eficiencia en el corte GST-proteína, la disolución se mantiene durante 16-20 horas a 20 °C.

Una vez producido el corte, y con objeto de conseguir un correcto plegamiento de la proteína y formación de puentes disulfuro, la muestra se somete a diálisis redox. El tampón de diálisis se compone de Tris 50 mM, CaCl₂ 10 mM, cistina 2 mM, cisteína 0.5 mM, pH 8.0. Esta diálisis se realiza en vasos de 5 L que se rempazan cada 4-5 horas manteniendo el proceso completo durante un periodo total de unas 40 horas. Debido al pequeño tamaño de las proteínas, las membranas utilizadas para la diálisis tienen un tamaño de poro de 1000 kDa (Cellusep).

3.1.1.6. Cromatografía en fase reversa por HPLC

El último paso de la purificación para la separación de la proteína de sus impurezas (trombina, GST, GST-proteína...) requiere una cromatografía en fase reversa a alta presión (HPLC) con una columna C₁₈polimérica (*Sunfire*).

La muestra se retira de la membrana de diálisis, se lleva a pH 2-3 con TFA al 5% para evitar interacciones electrostáticas inespecíficas con la columna y se filtra previo paso por la misma. Es importante tener en cuenta que la columna no es capaz de retener más de 150 mg de proteína a la hora de llevar a cabo la inyección y evitar en todo momento la entrada de aire en el sistema.

Se utiliza una disolución de agua *milli-Q* al 0.1% de TFA (Ácido trifluoroacético) como Tampón A (más polar), y una disolución menos polar de acetonitrilo al 0.1% de TFA como Tampón B (más apolar). A partir de un porcentaje 80/20 de tampón A y B al inicio del ensayo, se ejecuta un gradiente hasta 35% de B, de forma que se aumenta la hidrofobicidad y disminuyen las interacciones de la proteína con la columna. La elución de LR5 tiene lugar a un 22% de Tampón B, LR4 28% y LR45 31%. Todo el proceso tiene lugar a un flujo de 5 ml/min y tras la elución de la proteína, se procede a su cuantificación a partir de su coeficiente de extinción teórico, y la muestra es alicuotada.

3.1.1.7. Concentración y almacenamiento

Las proteínas purificadas del HPLC se congelan 2 h a -80 °C y después se liofilizan durante 24 h, es decir, se someten a vacío a una temperatura de -80°C de forma que se eliminan los componentes volátiles. Tras ello, la proteína se almacena a -20 °C durante el tiempo deseado hasta requerir su posterior uso.

3.1.1.8. Obtención forma apo

Para algunos experimentos resulta necesario la obtención de la forma apo de los módulos (apoLR). Para ello existen dos posibles alternativas: por un lado, puede utilizarse un agente quelante de metales como el EDTA^[34], o por el otro, resinas secuestradoras de cationes (Chelex 100 Resin, Bio-Rad) que añadidas sobre la disolución de proteína, en proporción de 1 gramo/100 ml de disolución, consiguen retirar el Ca²⁺ residual unido a los LR en aproximadamente una hora^[35].

3.1.1.9 Electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Obtenida la proteína de la cromatografía en fase reversa, conviene comprobar la pureza de la misma. Ésta se obtiene mediante la realización de una electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida en la que los componentes se separan según su peso molecular^[36].

3.1.2. Análisis interacción LR4, LR5, LR4-5 con Ca^{2+} y Mg^{2+}

3.1.2.1 Cinética de unión

La unión de los distintos módulos LR a Ca^{2+} y Mg^{2+} se analizó en función del tiempo en un sistema de flujo detenido SX17.MV de Applied Photophysics (Leatherhead, U.K.) acoplado a un detector de fluorescencia (figura 3.2).

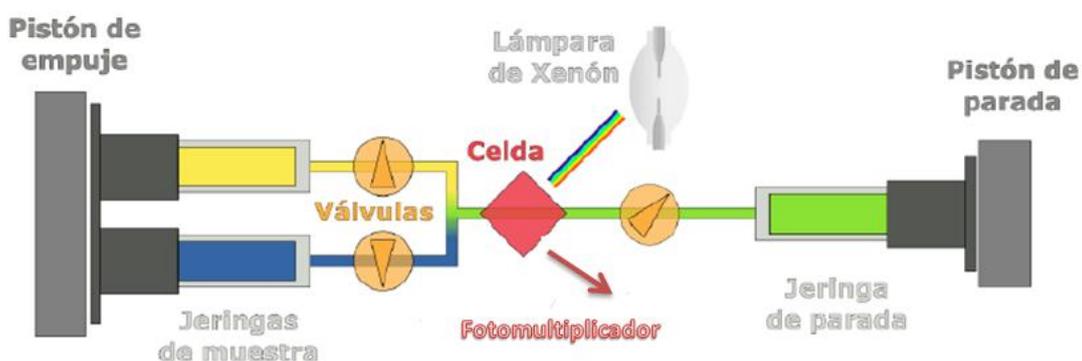


Figura 3.2: Esquema general del sistema de flujo detenido acoplado a un detector de fluorescencia (Stopped-flow)^[37].

La técnica consiste en la introducción de una mezcla de componentes a la cámara de observación a través de dos jeringas, y medición del cambio de alguna señal espectroscópica de alguno de los reactivos (emisión de fluorescencia en este caso) en muy poco espacio de tiempo.

Los reactivos pasan hasta la celda de observación y continúan hasta una tercera jeringa provista de un freno (jeringa de parada), que hace detener el flujo. La medida comienza tan pronto la mezcla alcanza la celda de observación por lo que es importante que el tiempo que transcurra desde que se produce la mezcla hasta la llegada a la cámara sea mínimo (tiempo muerto). De esta forma consiguen medirse reacciones transcurridas en pocos milisegundos.

3.1.2.1.1. Diseño experimental y ajuste de los datos

La unión de los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} a los módulos LR produce un aumento de fluorescencia como consecuencia de un cambio en el entorno de los residuos aromáticos

presentes en los LR. Por el contrario, la ausencia de los cationes provoca un cambio en el plegamiento de la proteína que hace que estos residuos se encuentren más expuestos al solvente que actúa apantallando la fluorescencia.

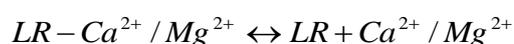
Todos los ensayos se llevaron a cabo a 25 °C utilizando como tampón Pipes 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7 para simular condiciones extracelulares, y Acetato 50 mM, NaCl 150 mM pH 5.5 simulando condiciones endosomales. La concentración de proteína requerida para llevar a cabo los ensayos es de 5 μM en el caso de LR4 y LR5, y 3 μM para LR4-5 (debido a su mayor contenido de residuos aromáticos). Para las medidas se utilizó un filtro de 305 nm que absorbe toda la radiación emitida por debajo de esa longitud de onda.

Ensayos de disociación

Se realizan ensayos en los que se observa la disociación de los iones unidos a la proteína, utilizando distintas concentraciones de EDTA. La hipótesis inicial sostiene que el EDTA retira el Ca^{2+} o Mg^{2+} libre sin desplazar al que se encuentra unido a la proteína. Por tanto la constante de disociación obtenida de este proceso resulta independiente de la concentración de agente quelante añadida.

La bajada de intensidad de fluorescencia puede ajustarse a una ecuación mono o bi-exponencial según sea el caso y se calcula la k_{obs} , que refleja esa disminución de señal, para cada concentración de agente quelante.

El esquema que rige el proceso de disociación viene dado por:



El proceso de disociación sigue una cinética de orden cero en la que la velocidad del proceso viene dada por la constante observable del proceso, k_{obs} donde $k_{obs} = k_{off}$, siendo k_{off} la constante cinética del proceso de disociación^[38].

Ensayos de asociación

Se realizan ensayos de unión de los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} a los distintos módulos LR. En este caso, en primer lugar, se quela el Ca^{2+} residual que acompaña a la proteína

resuspendiendo de nuevo con EDTA 50 μM . A partir de la forma apoLR, para cada ensayo se utilizan distintas concentraciones de Ca^{2+} obteniéndose de nuevo mediante el ajuste, una k_{obs} por cada concentración añadida.

El esquema dado por el proceso de asociación de los cationes a los módulos se representa de la siguiente forma:



En este caso y debido a que la concentración de catión es mucho mayor que la de los módulos, el modelo se ajusta a una cinética de pseudo-primer orden y viene dado por la siguiente ecuación^[38]:

$k_{obs} = k_{on} [Ca^{2+} / Mg^{2+}] + k_{off}$ siendo k_{on} la constante cinética de asociación del proceso y k_{off} , la constante correspondiente al proceso de disociación. La representación k_{obs} frente a la concentración de Ca^{2+} o Mg^{2+} da lugar a una recta con pendiente igual a k_{on} , y con punto de corte en el eje de ordenadas igual a k_{off} .

A partir del cálculo de las constantes cinéticas, puede calcularse el valor de la constante de equilibrio de disociación K_d que mide la fortaleza de la unión, como cociente de ambas constantes cinéticas (k_{off} / k_{on}).

El ajuste de las cinéticas se realizó mediante el software SX17.MV proporcionado por Applied Photophysics.

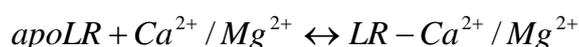
3.1.2.2 Termodinámica de unión

3.1.2.2.1. Ensayos de fluorescencia

La fluorescencia mide la emisión de luz de una muestra que ha sido previamente excitada. En las proteínas, los responsables de este fenómeno son los residuos aromáticos, entre los que destaca el Triptófano con un máximo de emisión a 350 nm tras la excitación a 280 nm. La emisión de estos residuos se encuentra estrechamente relacionada con el entorno en el que éstos se encuentran, por lo que, cambios en el plegamiento o interacción con otras proteínas producen variaciones de la señal.

Los ensayos se llevan a cabo en el fluorímetro Cary Eclipse (Varian). Para llevar a cabo los ensayos de fluorescencia se preparan disoluciones de los módulos LR (LR4, LR5 y LR4-5) en Pipes o Acetato 10 mM según corresponda. En primer lugar se añaden alícuotas (5 μ l) de EDTA 1 mM. A continuación, se añaden alícuotas (5 μ l) de Ca^{2+}/Mg^{2+} 1 mM, y se sigue la unión de los cationes a los módulos, hasta alcanzar la saturación.

Los dos equilibrios que tiene lugar en la disolución pueden representarse como:



Ninguno de los estados $EDTA$ o $EDTA - Ca^{2+}$ presenta fluorescencia por lo que la señal obtenida, F , es proporcional a la cantidad de complejo LR-catión formado y puede representarse como:

$$F = F_0 + \alpha [LR - Ca^{2+} / Mg^{2+}]$$

Donde F_0 corresponde a la fluorescencia inicial y α es el coeficiente de emisión.

Las curvas obtenidas se ajustan mediante la aplicación Origin 7.0, obteniéndose los valores de las constantes de equilibrio de disociación de cada módulo con los cationes a ambos pH.

3.1.2.2.2. Ensayos de calorimetría isoterma de titulación

La calorimetría de titulación isotérmica (ITC) caracteriza termodinámicamente la unión entre dos compuestos, midiendo la absorción o emisión de calor producido por la interacción entre los mismos. El sistema en el que se llevan a cabo los ensayos se denomina calorímetro y mide el cambio de potencia aportada al sistema, por unidad de tiempo, para mantener la temperatura constante, como consecuencia de la perturbación que provoca dicha interacción.

En este caso, un ensayo de ITC se basa en realizar inyecciones controladas de los cationes con concentración conocida, a una celda donde se encuentra la proteína. La inyección de ligando a la celda de muestra produce una absorción o emisión de calor, proporcional a la fracción de ligando unido^[39] (figura 3.3). Se realizan inyecciones sucesivas hasta alcanzar la

saturación de la proteína. Estos ensayos nos permiten calcular directamente la constante de asociación (K_a), así como la estequiometría del proceso de unión entre otros parámetros.

Los ensayos se llevan a cabo en el calorímetro MicroCal Auto ITC-200 y se realizan tanto en condiciones extracelulares como endosomales a una temperatura de 25 °C. Se trabaja con una concentración de proteína de 20 μM en Pipes o Acetato 10 mM, NaCl 150 mM. En este caso, para conseguir la forma apo de los módulos se utiliza la resina secuestradora de cationes (Chelex 100 Resin, Bio-Rad). A partir de ahí comienzan adicciones sucesivas de Ca^{2+} o Mg^{2+} y se mide la cantidad de calor absorbido o emitido asociado a cada inyección.

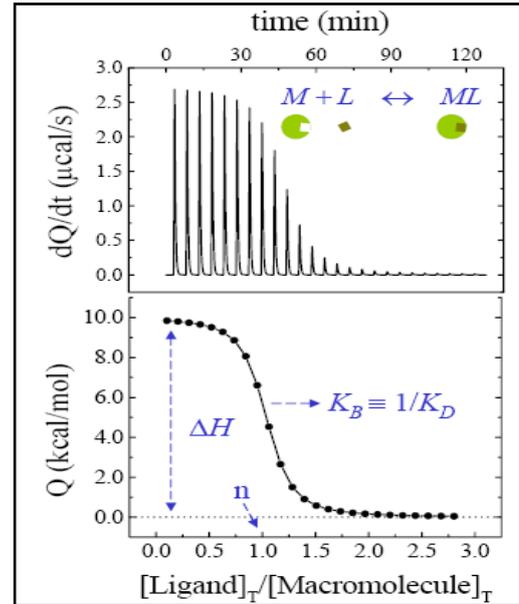
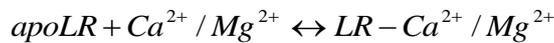


Figura 3.3: Ensayo de calorimetría de titulación isoterma. Se realizan adicciones sucesivas de ligando sobre la celda de medida y se mide el calor absorbido o emitido asociado a dicha interacción. Los ensayos se realizaron a 25 °C en condiciones extracelulares y endosomales

El equilibrio presente en la celda de medida puede representarse como:



$$\text{quedando, } K_{LR} = \frac{[LR - Ca^{2+} / Mg^{2+}]}{[apoLR] \times [Ca^{2+} / Mg^{2+}]}$$

donde K_{LR} corresponde a la constante de asociación derivada de la unión del Ca^{2+} o Mg^{2+} al módulo.

El calor liberado o emitido por cada inyección resulta proporcional a la cantidad de complejo $LR - Ca^{2+} / Mg^{2+}$ y a su correspondiente entalpía molar (ΔH_{LR}). Por tanto el calor asociado a cada inyección (q_i) se calcula mediante la resta del calor acumulado total después de cada inyección i y el correspondiente a la inyección anterior (q_{i-1}):

$$q_i = V \left(\Delta H_{LR} \left[[LR - Ca^{2+} / Mg^{2+}]_i - (1 - v/V) [LR - Ca^{2+} / Mg^{2+}]_{i-1} \right] \right)$$

donde V representa el volumen total de la celda, v el correspondiente a cada inyección, y $\Delta H_{LR}, \Delta H_{EDTA}$ las entalpías molares de cada proceso de unión.

3.2. Purificación y caracterización de LR (1-7)

3.2.1 Expresión y purificación de LR (1-7)

3.2.1.1. Expresión y transformación en células competentes

La expresión de este dominio tuvo lugar en células de *Pichia pastoris*, sistema eucariota capaz de expresar algunas proteínas que en *E.coli* resulta imposible o altamente complicado. La secuencia correspondiente a los módulos LR1-7 fue expresada en el vector de expresión pPICZ A por Juan Martínez. Entre los elementos importantes de este vector destacan el gen de resistencia a zeocina y un promotor inducible con metanol con el fin de conseguir sobreexpresión*. A la secuencia de la proteína se le añade una señal de exportación que provoca su secreción al exterior de la célula.

3.2.1.2. Crecimiento en placa y cultivo

Para la obtención de colonias se parte de gliceroles guardados a -80 °C que ya contenían las células con el plásmido incorporado. Se siembran 100 µl a una placa de YPD-Agar más zeocina 25 µg/µl (Anexo II) y se deja incubar durante 3 días a 30 °C .

Crecidas las colonias, se pasan en condiciones de esterilidad a erlenmeyers de 2 L con 250 ml de medio BMGY (Anexo II). Los erlenmeyers se dejan crecer a 30 °C durante 24 h con agitación (250 rpm). A continuación, se centrifuga 15 minutos a 5000 rpm en el rotor JA-10 de la centrífuga Avanti J-25 (*BeckmanCoulter*) y el pellet se resuspende en 250 ml de medio BMMY, medio de inducción (Anexo II). De nuevo se mantiene el cultivo, esta vez a 18 °C durante 72 horas con agitación. A las 24 y 48 horas aproximadamente se induce con metanol al 1%.

3.2.1.3 Filtración, concentración y diálisis

Una vez crecidas las células, las disoluciones se someten a centrifugación durante 30 min a 9000 rpm en el rotor JA-10 de la centrífuga Avanti J-25 (*Beckman Coulter*) tras la que se toma el sobrenadante. A continuación, se filtra con filtros de 0.45 µm y 0.22 µm para eliminar

Estabilidad e interacciones del dominio de unión del receptor de LDL

restos celulares. La disolución filtrada se pasa por un concentrador con una membrana de 10 kDa de poro, Pellicon XL (Millipore), reduciendo el contenido hasta un volumen aproximado de 20 ml. Se dializa con membranas de 10 kDa en Tris 30 mM, 5 mM fosfato sódico, pH 7.5.

3.2.1.4. Cromatografía de afinidad a hidroxapatito

La disolución concentrada se pasa por una columna de hidroxapatito (HA), Mini-CHT (Bio-Scale), en la que las proteínas se adsorben a una forma insoluble de fosfato de Ca^{2+} (HA). La columna se equilibra con tampón Tris 20 mM, 5mM fosfato sódico pH 7.5. Se carga la muestra por la columna y se eluye con Tris 20 mM, fosfato sódico 500 mM.

3.2.1.5. Diálisis redox

Con el fin de conseguir un buen plegamiento y formación de puentes disulfuro de la proteína, las muestras obtenidas de los dos pasos anteriores se someten a diálisis redox. El tampón de diálisis se compone de Tris 50 mM, CaCl_2 10 mM, cistina 2 mM, cisteína 0.5 mM, pH 8.0 y se sigue el mismo proceso explicado en el apartado 3.1.1.5.

3.2.1.6. Cromatografía de exclusión molecular

Las muestras dializadas se concentran en la centrífuga Centriuge 5810-R (Eppendorf) hasta un volumen aproximado de 1-1.5 ml, momento en el que se inyecta en la columna de exclusión molecular. En este tipo de cromatografía las proteínas se separan según su peso molecular. El tampón utilizado a lo largo de la cromatografía se compone de Tris 50 mM, NaCl 150 mM.

3.2.1.7. Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Al igual que en el apartado 3.1.18. la fracción recogida de la columna de exclusión molecular se somete a electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida con objeto de comprobar la pureza obtenida.

3.2.2. Caracterización de LR1-7

3.2.2.1. Espectrometría de masas (MALDI-TOF)

La espectrometría de masas (EM) MALDI-TOF es una técnica con gran capacidad de análisis, que proporciona información muy valiosa de las propiedades de las proteínas. Se basa en la ionización de las moléculas de la muestra, y separación de los fragmentos según su relación carga/masa.

En este caso, la EM se utiliza para comprobar realmente que la proteína obtenida es la deseada, así como para comprobar un correcto plegamiento de sus puentes disulfuro. Para comprobar esto último, la muestra se incuba con AEMTS y vinilpiridina (VP), compuestos que reaccionan con cisteínas libres de la proteína. Un aumento de masa en el espectro de masas significa reacción con ellos y, por tanto, presencia de cisteínas libres que no han formado los puentes disulfuro.

Los ensayos se llevan a cabo en el Instituto de Biotecnología Biomédica de Barcelona por Silvia Bronsons.

3.2.2.2. Caracterización espectroscópica

Absorbancia en UV-visible.

La absorción de radiación electromagnética en las proteínas se debe principalmente a la presencia de enlaces peptídicos, enlaces presentes en los anillos aromáticos de las proteínas o presencia de cofactores. El espectro de absorción en el UV-visible es característico de cada proteína

Para la obtención de los espectros de absorción de los módulos LR (1-7) se utilizó el espectrofotómetro Cary 100 (Varian) De la misma forma, se utiliza esta técnica para la cuantificación de la proteína tras el proceso de purificación midiendo su absorbancia a una longitud de onda de 280 nm, que corresponde a la absorción de los residuos aromáticos presentes. Para la cuantificación se utiliza la ley de Lambert-Beer ($A = \epsilon c l$) conociendo el coeficiente de extinción de la proteína a 280 nm (ϵ_{280}).

Fluorescencia

Los espectros de emisión de LR 1-7 en las distintas condiciones se llevan a cabo en el Fluorímetro Cary Eclipse (Varian). Se realizan espectros de emisión excitando a 280 nm, y se observan las diferencias entre la proteína purificada sin tratar, tras añadir EDTA y tras la adicción de Ca^{2+} .

3.2.2.3. Desnaturalizaciones térmicas seguidas por fluorescencia

El proceso de desnaturalización de las proteínas puede seguirse estudiando el cambio de fluorescencia como consecuencia del aumento de temperatura. Como consecuencia del aumento de temperatura, los módulos LR cambian de conformación de forma que se produce una mayor exposición de sus residuos aromáticos al solvente, que actúa apantallando la fluorescencia.

Las desnaturalizaciones de los módulos LR (1-7) se realizan en condiciones extracelulares e intracelulares en el Fluorímetro Cary Eclipse (Varian). La concentración de proteína utilizada es de 5 μM en Pipes o Acetato 10 mM, NaCl 150 mM y con Ca^{2+} 5 mM. Previo a la desnaturalización se realiza un espectro de fluorescencia de la muestra entre 300 y 450 nm. A continuación, se forma un gradiente de temperatura desde los 10 hasta 90 °C con un aumento de 1.5 °C/min. Se observa el descenso de fluorescencia a 350 nm, con una longitud de onda de excitación de 280 nm.

CAPÍTULO 4

Resultados

4.1. Interacción LR4, LR5 y LR4-5 con Ca^{2+} y Mg^{2+}

4.1.1. Resultados con LR5

Ensayos de asociación y disociación LR5- Ca^{2+} pH 5.5:

-ENSAYO DE DISOCIACIÓN

Determinación de k_{obs} para cada concentración de EDTA y la constante cinética de disociación final del proceso k_{off} . Las curvas de disociación obtenidas se ajustan a una ecuación monoexponencial con un único centro de unión para el Ca^{2+} .

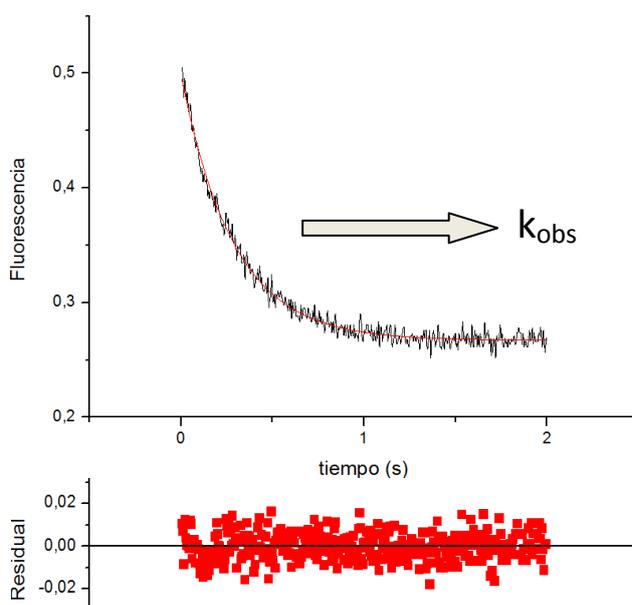
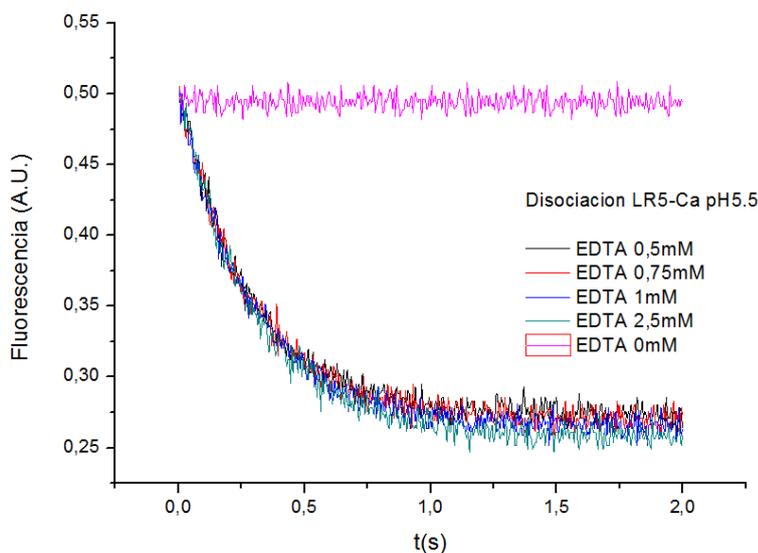


Figura 4.1: Curva de disociación obtenida para LR5- Ca^{2+} con una concentración de EDTA 750 μM . La curva se ajusta a una ecuación monoexponencial de la que puede calcularse el valor de la constante observable del proceso de disociación (k_{obs}). El residual muestra la posible desviación existente en cada punto que tal y como se observa, es una desviación muy pequeña.

Representando todas las curvas de disociación obtenidas:



[EDTA]mM	$k_{obs}(s^{-1})$
0,5	3,5
0,75	3,5
1	3,5
2,5	3,3

Tabla 4.1: Valores de k_{obs} obtenidos para cada concentración de EDTA. Se observa como k_{obs} y por tanto k_{off} permanecen constantes independientemente de la concentración de EDTA añadida

Figura 4.2: Representación gráfica en la que se observa la disminución de la fluorescencia con el tiempo provocada por un cambio de conformación del módulo debido a la pérdida del Ca^{2+} . LR5 5 μ M, Acetato 10 mM, NaCl 150 mM. Se observa como en ausencia de EDTA no hay disminución de señal.

Debido a que $k_{obs}=k_{off}$ y realizando una aproximación media de todos los valores, se obtiene un valor de $k_{off}= 3.45\pm 0.02 s^{-1}$

-ENSAYO DE ASOCIACIÓN

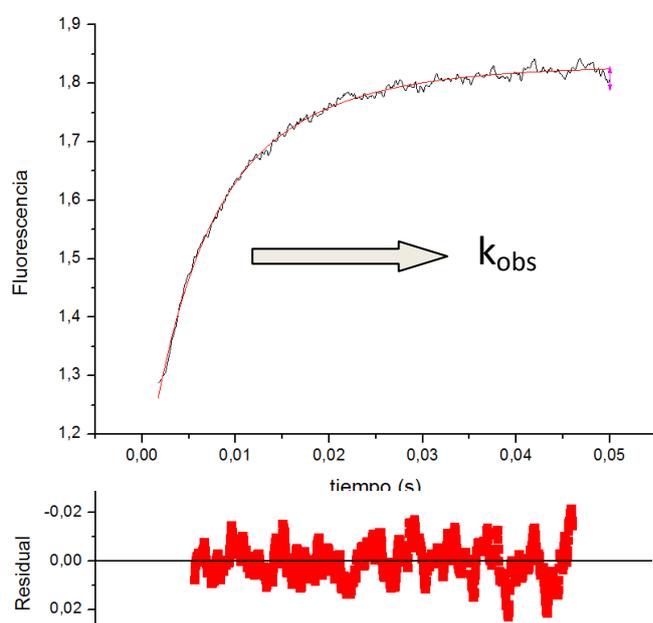


Figura 4.3: Curva de asociación obtenida para LR5- Ca^{2+} con una concentración de Ca^{2+} 25 μ M. El ajuste corresponde a una ecuación monoexponencial a partir de la que se calcula el valor de la constante observable del proceso (k_{obs}).

Representando todas las curvas de asociación en una misma figura:

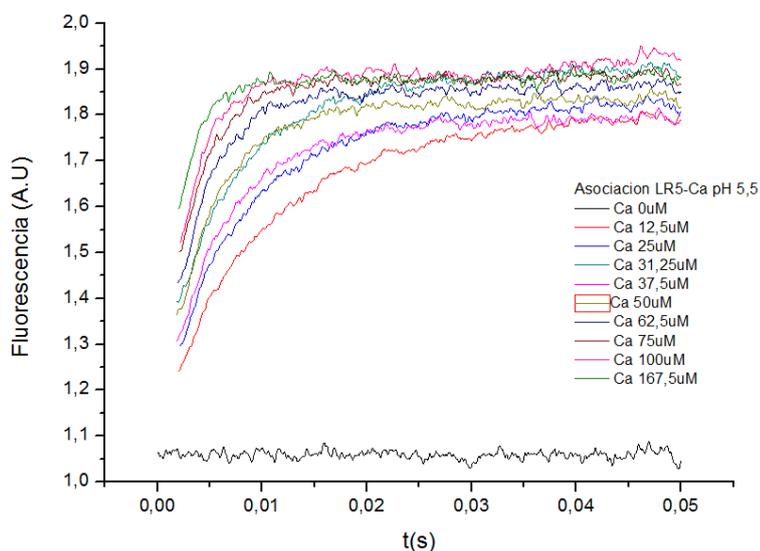


Figura 4.4. Curvas obtenidas de los ensayos de asociación de LR5 en condiciones endosomales (pH 5.5). Se observa el aumento de fluorescencia con el tiempo, obteniéndose curvas más pronunciadas según se aumenta la concentración de catión. La concentración de LR5 es de 5 μM en Acetato 10 mM, NaCl 150 mM y con EDTA 50 μM .

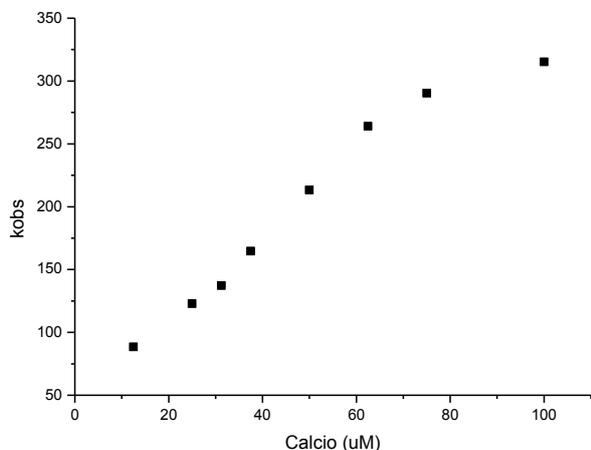
$[\text{Ca}^{2+}]\mu\text{M}$	$k_{\text{obs}} (\text{s}^{-1})$
12.5	88.4
25	122.8
31.25	137.2
37.5	164.7
50	213.3
62.5	264
75	290.3
100	315.2
167.5	330.7

Tabla 4.2: k_{obs} obtenidos con concentraciones crecientes de Ca^{2+} . k_{obs} aumenta según lo hace la concentración de catión hasta que se alcanzan concentraciones saturantes.

La reacción del módulo LR5 con Ca^{2+} tiene lugar de forma muy rápida, en pocos milisegundos (figura 4.4). El tiempo muerto del aparato hace que al realizarse las cinéticas se pierdan los primeros milisegundos de las curvas obtenidas, y este hecho, se hace más notorio en cinéticas rápidas como la anterior.

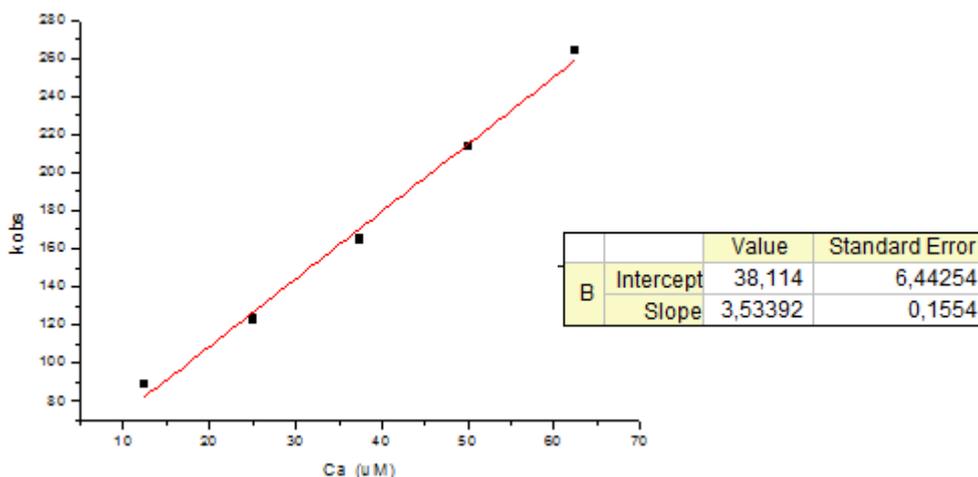
Las concentraciones de Ca^{2+} representadas en la figura y en la tabla corresponden a las concentraciones reales presentes en la disolución. Estas se obtienen al realizar la diferencia entre la concentración colocada en la jeringa menos la de EDTA previamente añadida (50 μM) y, todo ello dividido entre dos, ya que se realiza una mezcla equitativa de catión y proteína.

Obtenidos los valores de k_{OBS} para cada concentración de Ca^{2+} , los datos se representan en la siguiente gráfica.



Gráfica 4.1: Representación gráfica k_{OBS} vs $[Ca^{2+}]$. Se observa una dependencia lineal inicial al principio de la gráfica, que se pierde al alcanzar concentraciones saturantes.

Se observa al inicio de la gráfica una dependencia lineal de la señal obtenida con la concentración de Ca^{2+} , que se curva al alcanzar concentraciones saturantes. Este intervalo lineal se utiliza para el cálculo de las constantes cinéticas, tal como se ha explicado en el apartado 3.1.2.1.1, mediante el ajuste a un modelo cinético de pseudo-primer orden.



Gráfica 4.2: Representación gráfica k_{obs} vs $[Ca^{2+}]$ de la parte lineal anterior, utilizada para el cálculo de las constantes cinéticas del proceso.

Según se ha explicado anteriormente, $k_{obs} = k_{on}[Ca^{2+}] + k_{off}$ por lo que teniendo en cuenta los valores obtenidos del ajuste a la recta:

$$k_{on} = 3,53 \pm 0.15 \mu M^{-1} s^{-1}$$

$$k_{off} = 38.1 \pm 6.44 s^{-1}$$

Tal y como se observa en estos últimos resultados, el valor de k_{off} no corresponde con el obtenido para el ensayo de disociación. Una causa a esta desviación se encuentra en la pérdida del inicio de la reacción como consecuencia del tiempo muerto del equipo, que da como resultado un incompleto ajuste de la curva cinética y por tanto, desviaciones en los valores de k_{obs} . Otro motivo reside en el hecho de que en este caso, para obtener curvas cinéticas de las que puedan extraerse datos, es necesario trabajar con bajas concentraciones de Ca^{2+} . En este caso la aproximación de pseudo-primer orden en la que $[cación] \gg [LR]$ no es del todo correcta y presenta algunas inexactitudes. Es por este motivo que también se realizan los ensayos de disociación en los que el cálculo de la k_{off} resulta mucho más preciso.

El cálculo y valor de k_{on} , sí tienen lugar de forma más precisa ya que se determina por la pendiente de la recta y no a partir de un punto, por lo que los resultados obtenidos de los ensayos de asociación corresponden con valores verdaderos,

Finalmente como resultado de ambos ensayos LR5- Ca^{2+} , los valores obtenidos son:

$$k_{on} = 3.53 \pm 0.15 \mu M^{-1} s^{-1}$$

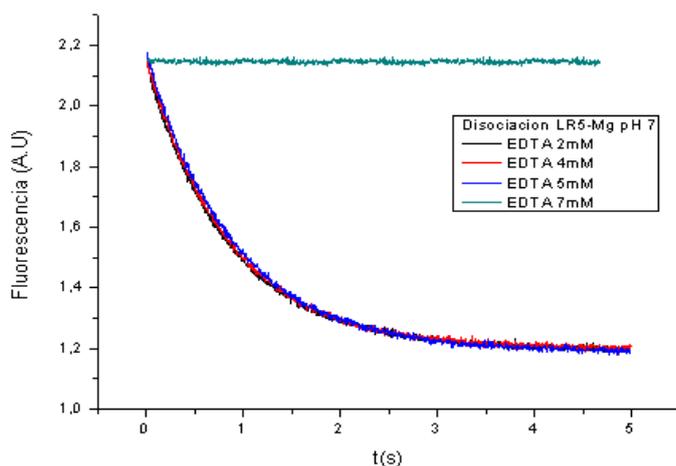
$$k_{off} = 3.45 \pm 0.02 s^{-1}$$

El cociente entre los dos anteriores da como resultado el valor de la constante de equilibrio de disociación para este proceso:

$$K_d: 0.98 \pm 0.1 \mu M$$

Ensayos de asociación y disociación LR5-Mg²⁺ pH 7

-ENSAYO DE DISOCIACIÓN



[EDTA]mM	k _{obs} (s ⁻¹)
2	1.20
4	1.15
5	1.17

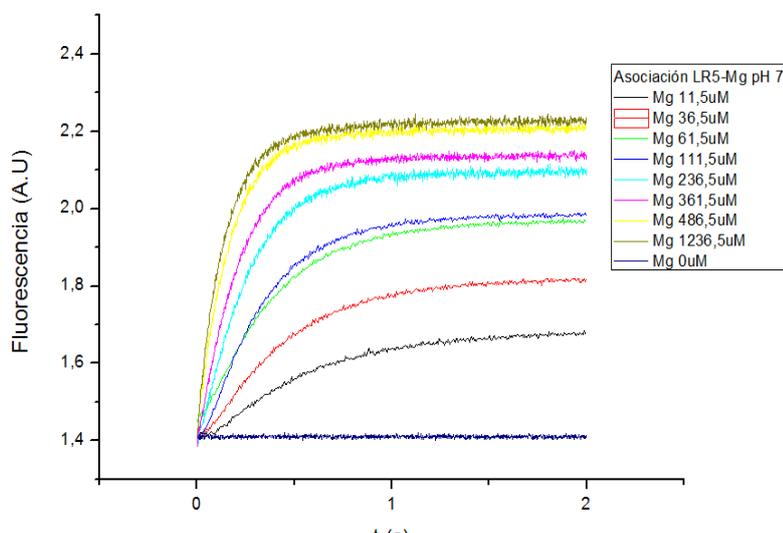
Tabla 4.3: Valores de k_{obs} obtenidos para cada concentración de EDTA.

Figura 4.5: Curvas de disociación obtenidas para cada concentración de EDTA. LR5 5 μM, Pipes 10 mM, NaCl 150 mM

Como $k_{obs} = k_{off}$, se obtiene una constante cinética para el proceso de disociación LR5-Mg²⁺,

$$k_{off}: 1.17 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$$

-ENSAYO DE ASOCIACIÓN

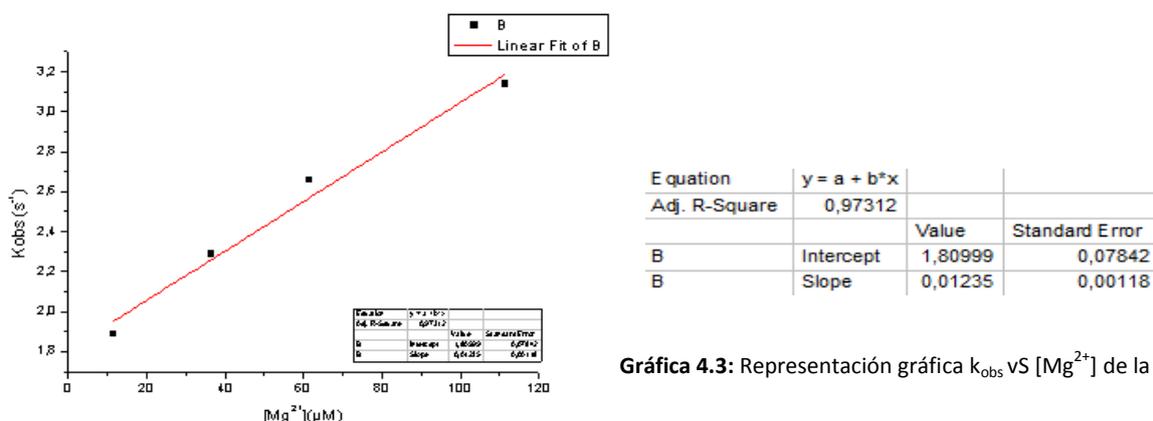


[Mg ²⁺]μM	k _{obs} (s ⁻¹)
11.5	1.89
36.5	2.29
61.5	2.66
111.5	3.14
236.5	4.17
361.5	4.90
486.5	5.91
1236.5	6.64

Figura 4.6: Curvas cinéticas de asociación obtenidas para cada concentración de Mg²⁺. LR5 5 μM, Pipes 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 100 mM.

Tabla 4.4: Valores de k_{obs} obtenidos para cada concentración de Mg²⁺.

Al igual que para el Ca^{2+} , los valores de k_{obs} se representan frente a la concentración de Mg^{2+} y se extrae la parte lineal para el cálculo de las constantes cinéticas (gráfica 4.3).



Gráfica 4.3: Representación gráfica k_{obs} vs $[\text{Mg}^{2+}]$ de la parte lineal

Aplicando la ecuación de pseudo-primer orden:

$$k_{\text{on}} = 0.012 \pm 0.0018 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$$

$$k_{\text{off}} = 1.81 \pm 0.078 \text{s}^{-1}$$

$$K_d = 151 \pm 6.49 \mu\text{M}^{[33]}$$

Ensayos de asociación y disociación LR5-Mg²⁺ pH 5.5

-ENSAYO DE DISOCIACIÓN

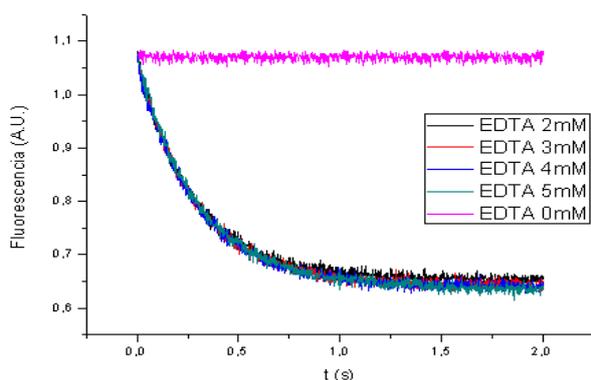


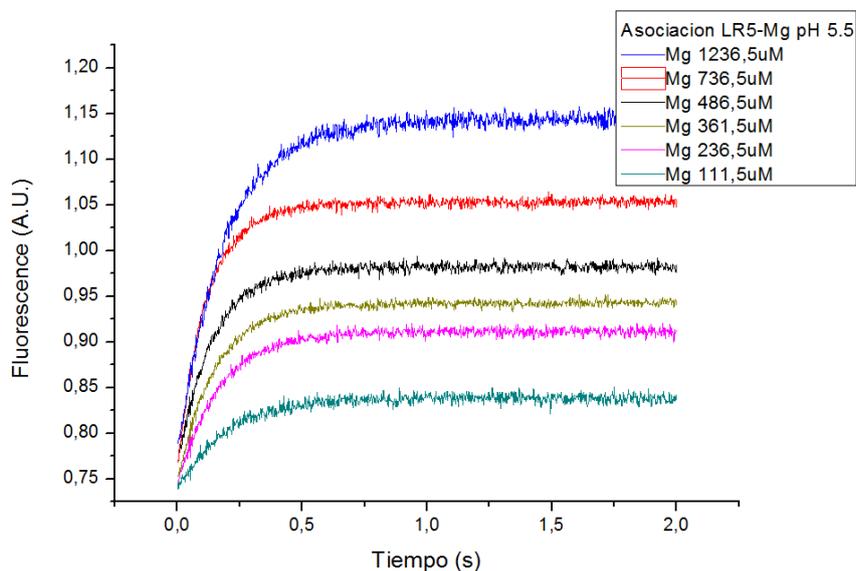
Figura 4.7: Curvas de disociación obtenidas para cada concentración de EDTA. LR5 5 μM , Acetato 10 mM, NaCl 150 mM

[EDTA]mM	$k_{\text{obs}}(\text{s}^{-1})$
2	3.5
3	3.48
4	3.45
5	3.4

Tabla 4.5: Valores de k_{obs} obtenidos para cada concentración de EDTA.

$$k_{\text{off}} = 3.46 \pm 0.3 \text{s}^{-1}$$

-ENSAYO DE ASOCIACIÓN

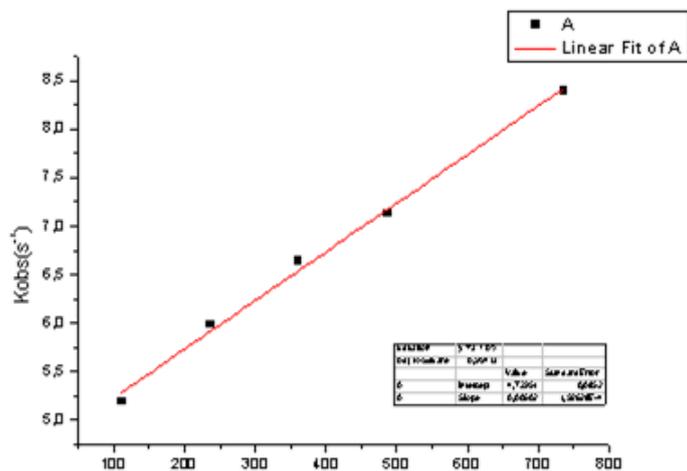


[Mg ²⁺] μ M	k _{obs} (s ⁻¹)
111.5	5.19
236.5	5.98
361.5	6.64
486.5	7.13
736.5	8.40
1236.5	10.63

Figura 4.8: Curvas cinéticas de asociación obtenidas para cada concentración de Mg²⁺.LR5 5 μ M, Pipes 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 100 mM.

Tabla 4.6: Valores de k_{obs} obtenidos para cada concentración de Mg²⁺.

Representando los valores de k_{obs} frente a la concentración de Mg²⁺:



Gráfica 4.4: Representación gráfica k_{obs} vs [Mg²⁺] de la parte lineal

Del ajuste de la gráfica 4.4 se extrae:

$$k_{on} = 0.050 \pm 0.00019 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$$

$$k_{off} = 4.73 \pm 0.082 \text{s}^{-1}$$

$$K_d = 909.6 \pm 15.8 \mu\text{M}^{[33]}$$

RESULTADOS PARA LR5

	$k_{on}(\mu M^{-1} s^{-1})$		$k_{off} (s^{-1})$		$K_D (\mu M)$	
	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Mg^{2+}
pH 7	2.45*	0.012	1.33*	1.17	0.54*	151
pH 5.5	3.53	0.050	3.45	3.46	0.98	909

Tabla 4.7: Resumen de valores de constantes cinéticas de asociación, disociación y constante de equilibrio de disociación obtenidas para cada catión en distintas condiciones de pH. *Datos correspondientes a ensayos anteriores llevados a cabo en el grupo.

4.1.2 Resultados con LR4

Ensayos de asociación y disociación LR4-Ca²⁺ pH 7

-ENSAYOS DE DISOCIACIÓN

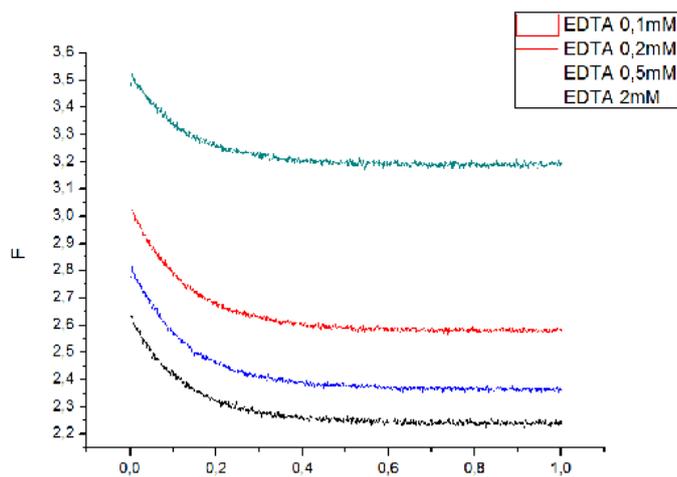


Figura 4.9: Cinéticas de disociación obtenidas para cada concentración de EDTA. LR4 5 μ M, Pipes 10 mM, NaCl 150 mM

[EDTA]mM	$k_{obs}(s^{-1})$
0.1	7.75
0.2	7.68
0.5	7.71
2	7.87

Tabla 4.8: Valores de k_{obs} obtenidos para cada concentración de EDTA.

$$k_{off}: 7.76 \pm 0.03 \text{ s}^{-1}$$

En los ensayos anteriores, las curvas de disociación no se superponen como lo hacían para LR5, porque al hacer el ensayo se trabajó a distintos voltajes para cada concentración de EDTA. Este hecho, no afecta al cálculo de las constantes cinéticas que, como se observa en la tabla 4.8 presentan valores similares independientemente de la concentración de EDTA utilizada.

-ENSAYOS DE ASOCIACIÓN

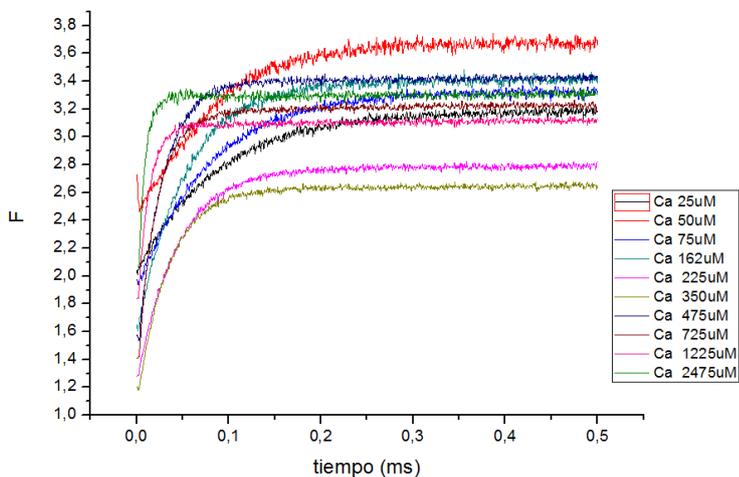
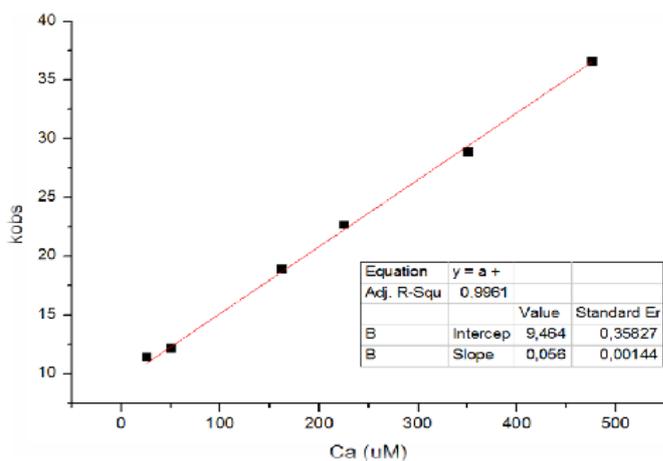


Figura 4.10: Cinéticas de asociación obtenidas con distintas concentraciones de Ca²⁺. LR4 5 μM, Pipes 10 mM, NaCl 150 mM.

[Ca ²⁺] _{μM}	k _{obs} (s ⁻¹)
25	11.5
50	12.2
75	12.8
162	18.9
225	22.7
350	28.9
475	36.3
725	45.4
1225	75.7
2475	121.8

Tabla 4.9: Valores de k_{obs} obtenidos con cada concentración de Ca²⁺.

Representando los valores de k_{obs} frente a las concentraciones de Ca²⁺:



Gráfica 4.5: Representación gráfica k_{obs} vs [Ca²⁺]

$$k_{on} = 0.056 \pm 0.001 \mu M^{-1} s^{-1}$$

$$k_{off} = 9.46 \pm 0.36 s^{-1}$$

$$K_d = 168 \pm 6.39 \mu M^{[40]}$$

En este caso, para validar los resultados anteriores, también se llevo a cabo una caracterización termodinámica de la interacción. Los resultados de la titulación con

fluorescencia se representan en la figura 4.11; El análisis de la titulación obtenida mediante la adición de pequeñas alícuotas del catión, permite la caracterización y cálculo de la constante de asociación de dicha interacción. En este caso se obtiene una constante de equilibrio de asociación, $K_a = 5937 \pm 138.9 \text{ M}^{-1}$, que se traduce en una constante de disociación ($K_a =$

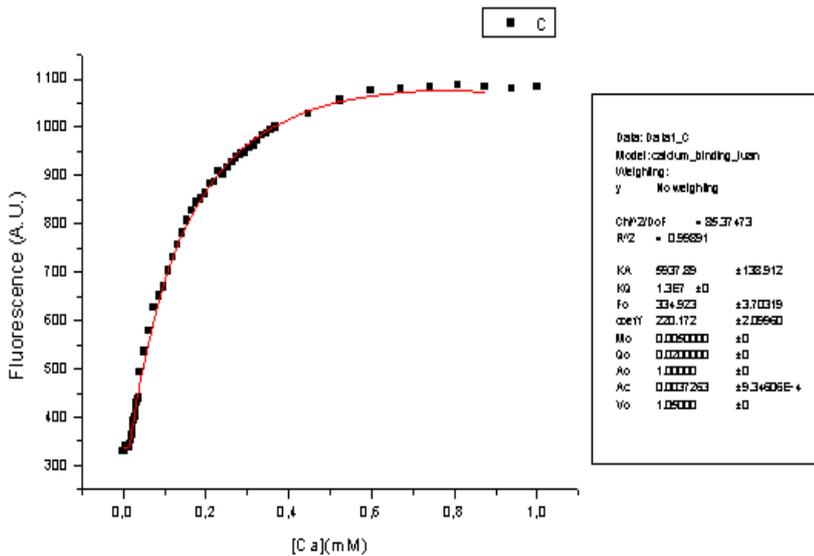


Figura 4.11: Titulación de fluorescencia que refleja el aumento de señal debido a la asociación de Ca^{2+} a apoLR4. LR4 5 μM , Pipes 10 mM, EDTA 50 μM .

$1/K_d$), $K_d = 168 \pm 3.9 \mu\text{M}$. Este resultado es similar y valida los obtenidos mediante los ensayos

cinéticos.

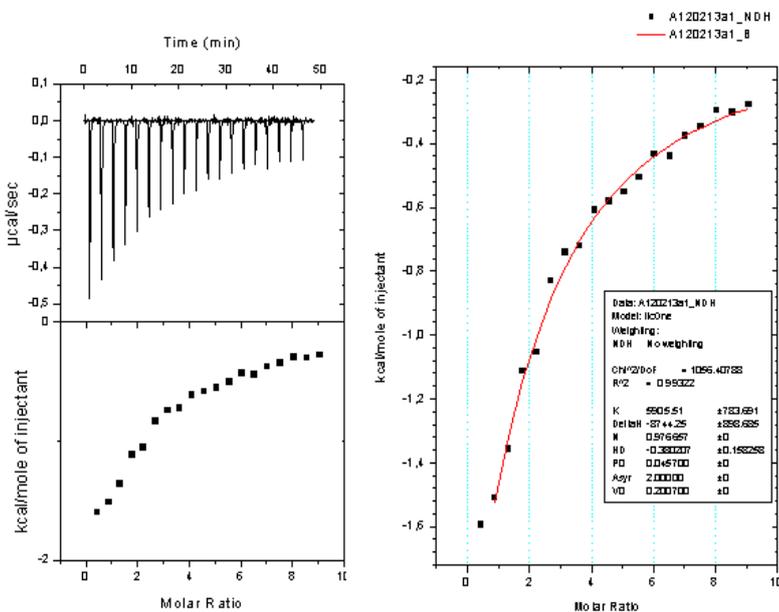


Figura 4.12: Titulaciones De Ca^{2+} sobre disoluciones de apoLR4 medidas por ITC. Para la obtención de la forma apoLR4 se utiliza la resina Chelex-100. LR4 20 μM , Pipes 10 mM, NaCl 150 mM.

De la misma forma, y con objeto de comprobar los datos anteriores, se realiza un ensayo de calorimetría de titulación isotérmica. Se obtiene un valor de $K_a = 5905 \pm 783.7 \text{ M}^{-1}$, valor que equivale a una $K_d = 167 \pm 22.2 \mu\text{M}$ y que valida una vez más, los valores anteriormente obtenidos. Resultado de este ensayo puede extraerse también la estequiometría de la interacción, reflejando un único sitio de unión para el Ca^{2+} .

Ensayos de asociación y disociación LR4-Ca²⁺ pH 5.5

-ENSAYO DE DISOCIACIÓN

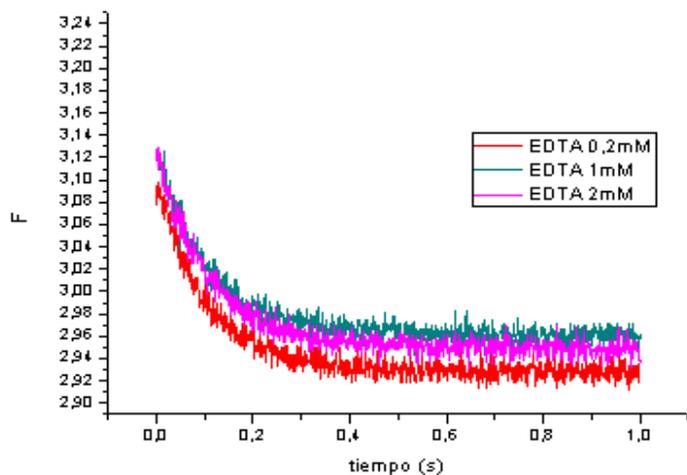


Figura 4.13: Curvas de disociación obtenidas para cada concentración de EDTA. LR4 5 μM, Acetato 10 mM, NaCl 150 mM

[EDTA]mM	k _{obs} (s ⁻¹)
0.2	9.55
1	9.21
2	9.26

Tabla 4.10: Valores de k_{obs} obtenidos para cada una de las concentraciones de EDTA.

k_{off}: 9.32 ± s⁻¹

-ENSAYO DE ASOCIACIÓN

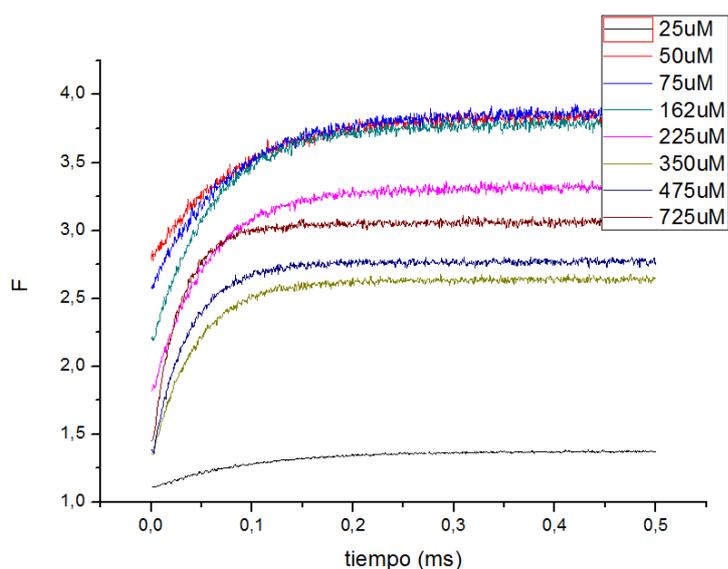
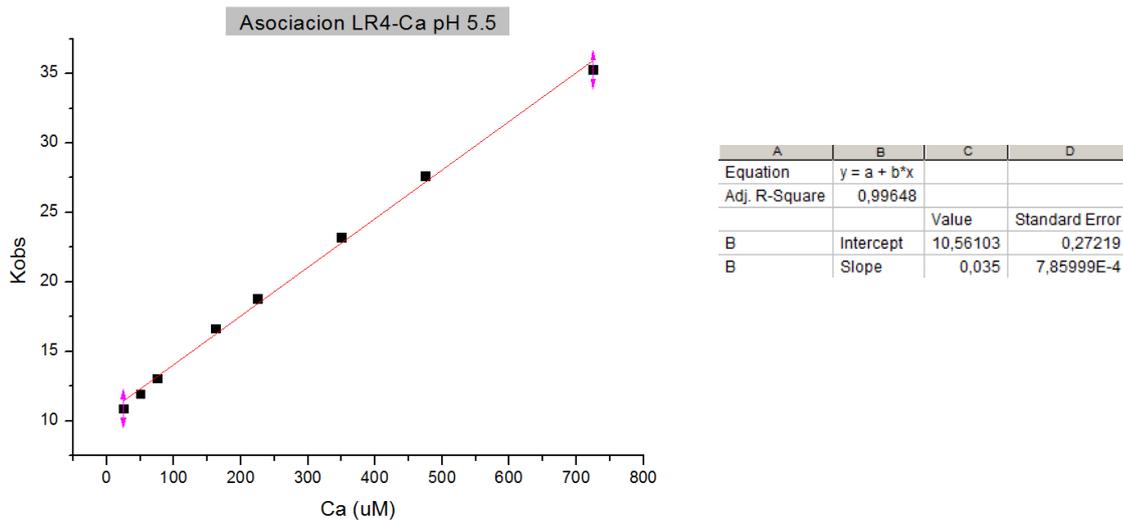


Figura 4.14: Curvas cinéticas de asociación LR4-Ca²⁺. LR4 5 μM, Acetato 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 50 μM.

[Ca ²⁺]μM	k _{obs} (s ⁻¹)
25	11.5
50	12.2
75	12.8
162	18.9
225	22.7
350	28.9
475	36.3
725	45.4

Tabla 4.11: Valores de k_{obs} obtenidos para cada una de las concentraciones de EDTA.

Representando k_{obs} frente a la concentración de Ca^{2+} :



Gráfica 4.6: Representación gráfica k_{obs} vs $[Ca^{2+}]$ pH 5.5

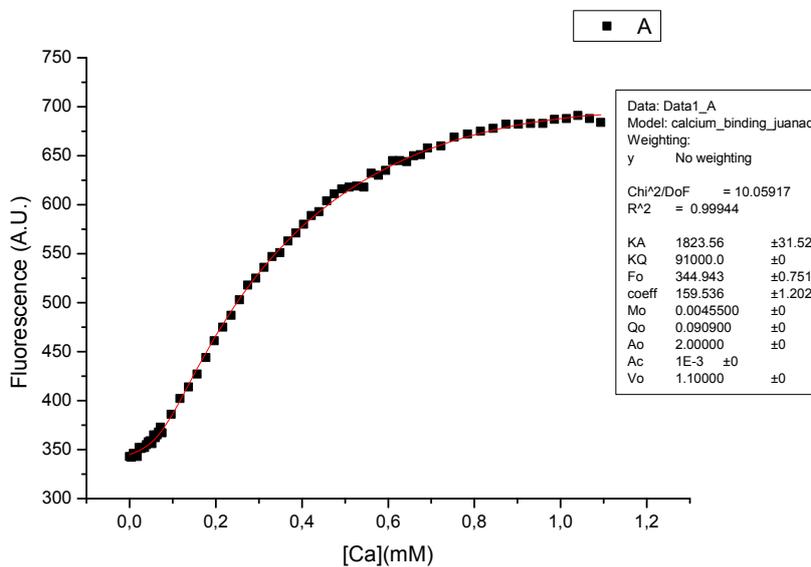
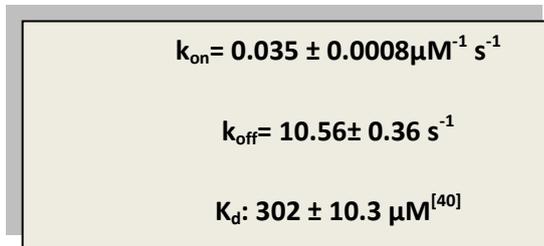


Figura 4.15: Titulación de fluorescencia que refleja el aumento de señal debido a la asociación de Ca^{2+} a apoLR4. LR4 5 μM , Pipes 10 mM EDTA 50 μM

De nuevo, y para comprobar los anteriores resultados se realizó una titulación por fluorescencia LR5- Ca^{2+} pH 5.5. Se obtuvo una constante de asociación, $K_a = 1823 \pm 31.52 M^{-1}$, lo que equivale a un valor de $K_D = 548 \pm 9.34 \mu M$

Se realizaron ensayos de asociación y disociación LR4- Mg^{2+} . Sin embargo, en ningún caso se obtuvo ningún resultado que reflejase dicha interacción.

4.1.3. Resultados con LR45

Ensayos de disociación LR45-Ca²⁺ pH 7

-ENSAYO DE DISOCIACIÓN

En este caso, LR45 presenta dos centros de coordinación con el Ca²⁺, uno por módulo LR. La obtención de las constantes observables de las curvas de disociación se obtienen tras el ajuste a una ecuación biexponencial (figura 4.16).

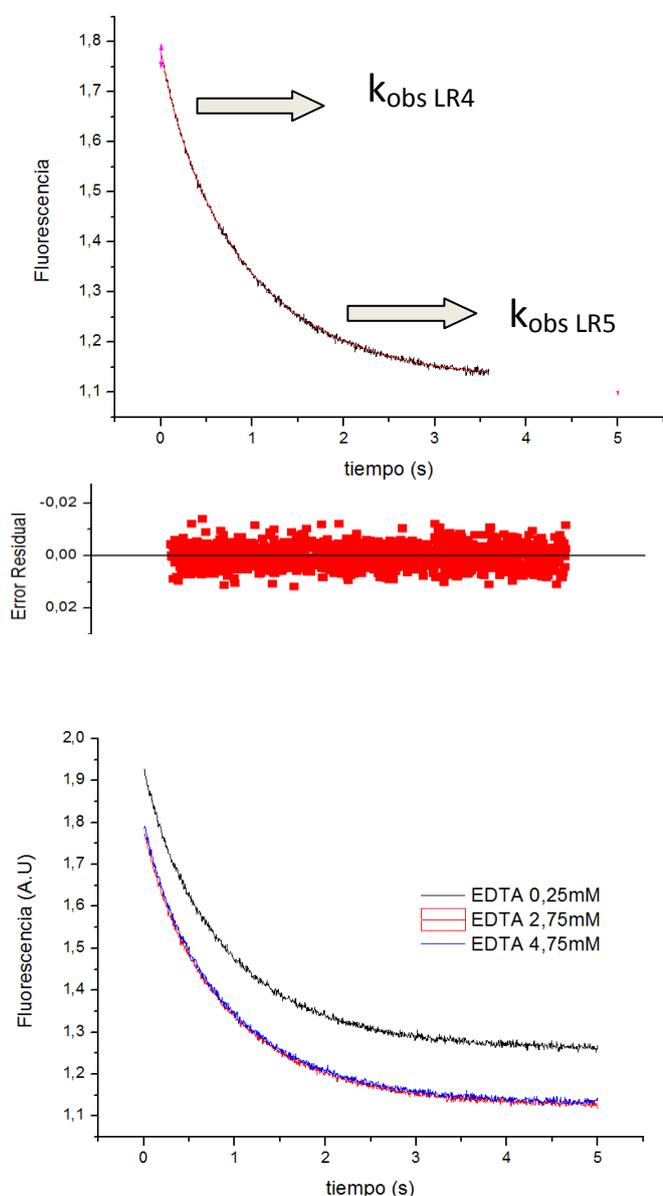


Figura 4.16: Cinéticas de disociación LR45-Ca²⁺ obtenida a una concentración de EDTA 2.75 mM. Existen dos centros de coordinación con el Ca²⁺, uno por módulo LR, por lo que el ajuste se realiza en este caso a una ecuación biexponencial.

Figura 4.17: Curvas de disociación LR45-Ca²⁺ pH 7. LR45 3 μM, Pipes 10 mM, NaCl 150 mM, Ca²⁺ 0.25 mM, pH 7.

[EDTA]mM	k _{obs} LR5(s ⁻¹)	k _{obs} LR4(s ⁻¹)
0.25	1.761	5.095
2.75	1.766	4.637
4.75	1.189	4.329

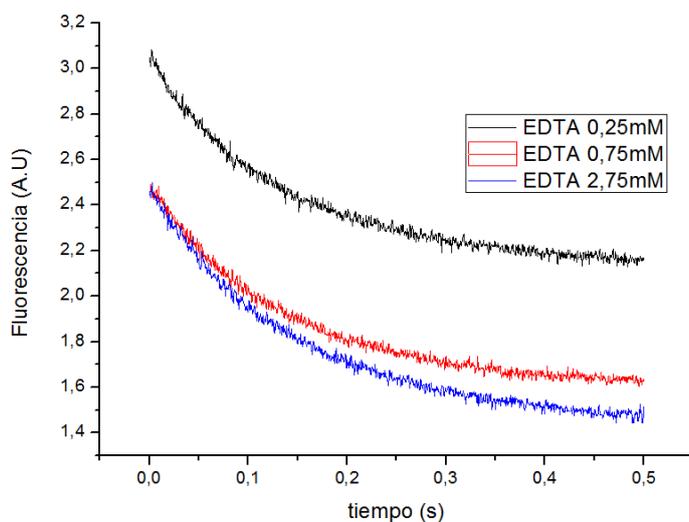
Tabla 4.12: k_{obs} obtenidos para cada una de las concentraciones de EDTA. Se obtienen valores de k_{obs} para los dos módulos tras el ajuste a una ecuación biexponencial

$$k_{\text{obs LR5}} = 1.57 \pm 0.03 \text{ s}^{-1}$$

$$k_{\text{obs LR4}} = 4.69 \pm 0.09 \text{ s}^{-1}$$

Ensayos de disociación LR45-Ca²⁺ pH 5.5

ENSAYOS DE DISOCIACIÓN



[EDTA]mM	$k_{\text{obs LR5}}(\text{s}^{-1})$	$k_{\text{obs LR4}}(\text{s}^{-1})$
0.25	4.68	12.66
0.75	5.28	11.31
4.75	5.14	12.52

Figura 4.18: Curvas de disociación LR45-Ca²⁺ pH 5.5. LR45 3 μM , Pipes 10 mM, NaCl 150 mM, Ca²⁺ 0.25 mM, pH 7.

Tabla 4.12: Valores de k_{obs} obtenidos para cada una de las concentraciones de EDTA. Se obtienen valores de k_{obs} para los dos módulos tras el ajuste a una exponencial doble

$$k_{\text{off LR5}} = 5.03 \pm 0.1 \text{ s}^{-1}$$

$$k_{\text{off LR4}} = 12.16 \pm 0.24 \text{ s}^{-1}$$

Se realizaron ensayos de asociación del tándem LR4-5 a pH 5.5. Sin embargo, la gran diferencia de afinidades que existe entre los dos módulos LR4 y LR5 dificulta enormemente el ajuste de las curvas cinéticas que se obtienen. De la misma forma resulta complicado el análisis por técnicas termodinámicas tales como fluorescencia e ITC, y resulta complicado obtener resultados fiables. Este problema se está tratando de solucionar de forma que puedan obtenerse resultados que reflejen dicha interacción.

Ensayos de asociación y disociación LR45-Mg²⁺ pH 5.5

-ENSAYOS DE DISOCIACIÓN

Realizadas las cinéticas LR4-Mg²⁺ sin observar interacción entre ambas, se procede a ensayar la interacción del tándem LR45-Mg²⁺. Validando la hipótesis anterior, las curvas cinéticas de asociación obtenidas se ajustan a una ecuación monoexponencial con el cálculo de una única k_{obs} correspondiente a la asociación del Mg²⁺ al módulo LR5.

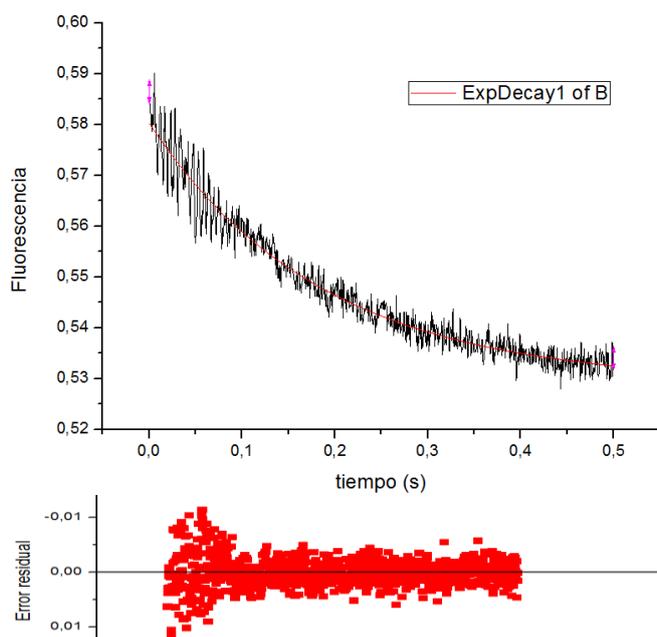


Figura 4.19: Cinética de disociación LR45-Mg²⁺ obtenida a una concentración de EDTA 10 mM. El ajuste se realiza a una ecuación monoexponencial a pesar de los dos posibles centros de coordinación con el catión.

Representando todas las curvas de disociación obtenidas con cada concentración de EDTA:

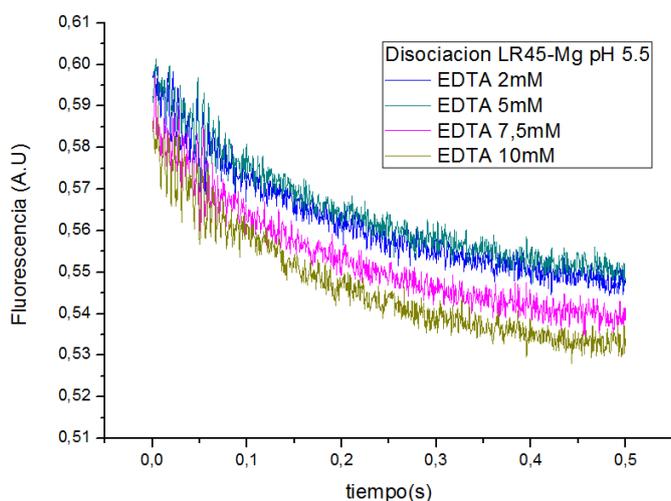


Figura 4.20: Curvas de disociación LR45-Mg²⁺ pH 5.5 LR4-5 3 μM, Acetato 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, Mg²⁺ 0.25mM

[EDTA]mM	$k_{obs LR5}(s^{-1})$
2	5.34
5	5.21
7.5	5.53
10	5.44

Tabla 4.13: k_{obs} obtenidos para cada una de las concentraciones de EDTA empleadas en el ensayo tras el ajuste a un sistema monoexponencial.

$$k_{\text{off}} = 5.38 \pm 0.11 \text{ s}^{-1}$$

ENSAYOS DE ASOCIACIÓN

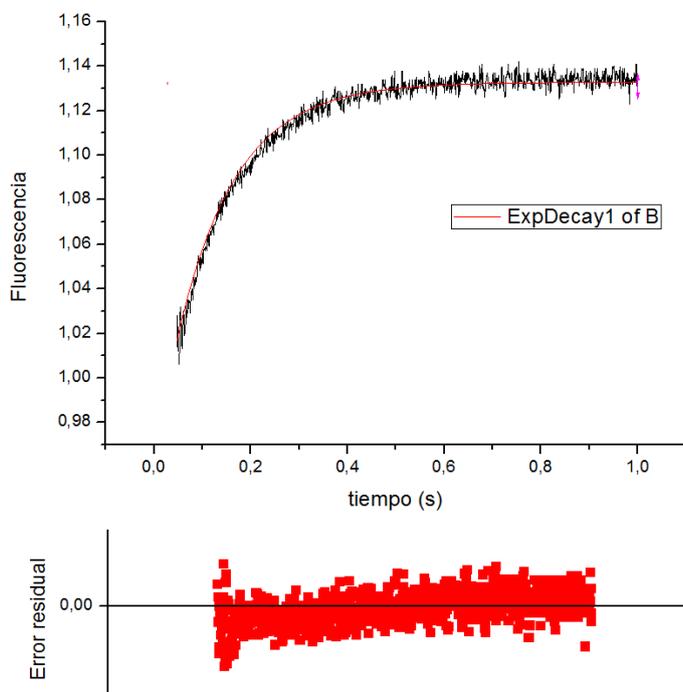


Figura 4.21: Cinética de asociación LR45- Mg^{2+} obtenida a una concentración de Mg^{2+} 225 μM . El ajuste se realiza a una ecuación monoexponencial

Representando las curvas de asociación con cada concentración de Mg^{2+}

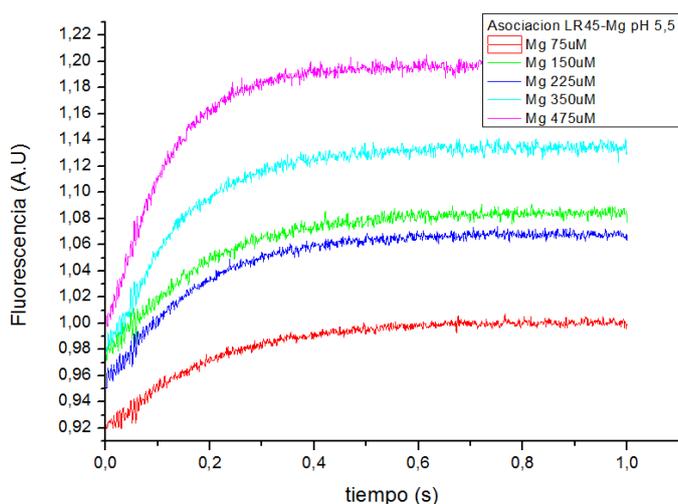
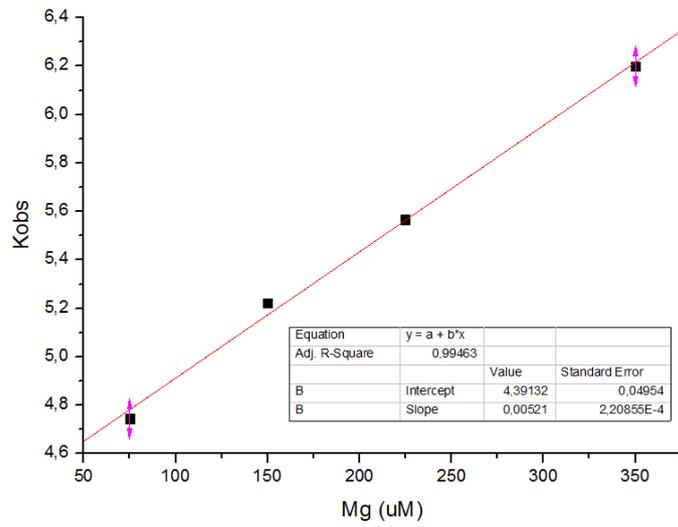


Figura 4.21: Curvas de asociación LR45- Mg^{2+} pH 5.5. LR4-5 3 μM , Acetato 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 50 μM .

$[\text{Mg}^{2+}]\mu\text{M}$	$k_{\text{obs}} (\text{s}^{-1})$
75	4.75
150	5.22
225	5.57
350	6.16
475	7.22

Tabla 4.14: k_{obs} obtenidos para cada concentración de Mg^{2+} empleada en el ensayo tras el ajuste a un sistema monoexponencial.



Gráfica 4.7: Representación k_{obs} frente a la concentración de Mg^{2+}

$$k_{on} = 0.052 \pm 0.0002 \mu M^{-1} s^{-1}$$

$$k_{off} = 4.39 \pm 0.04 s^{-1}$$

$$K_d = 844.23 \pm 7.69 \mu M *$$

4.2. Purificación y caracterización LR 1-7

4.2.1. Purificación LR1-7

Se obtuvo la proteína pura en pequeñas cantidades, tras el proceso completo de purificación. La figura 4.22 muestra lo obtenido tras cada una de las etapas de la purificación.

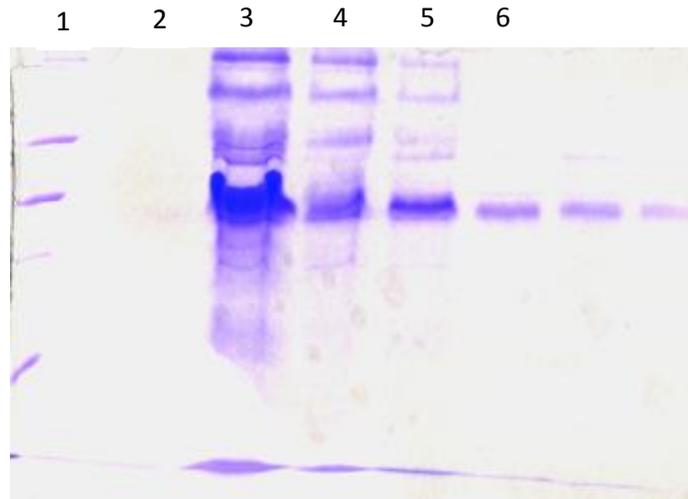


Figura 4.22: Bandas correspondientes a la SDS-PAGE realizada tras la purificación del LR1-7.

1-. Marcador Peso Molecular

4-. Retenido columna HA

2-. No concentrado

5-. No retenido columna HA

3-. Concentrado

6-7-8. LR1-7 pura tras exclusión molecular

El cromatograma de la figura 4.23 muestra el último paso de la purificación del que se obtiene la proteína pura (V: 140 ml). Los picos estrechos son burbujas de aire, los picos a 110 ml corresponde a agregados y los de 125 ml a otra proteína que secreta *P.pastorys*.

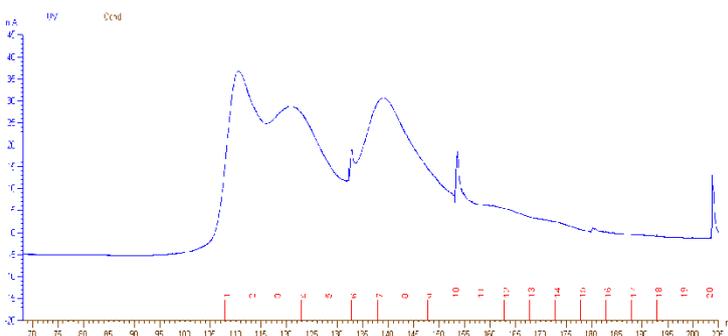


Figura 4.23: Cromatograma de exclusión molecular. El pico que corresponde al módulo LR1-7 se observa en un volumen aproximado de 140 ml.

4.2.2. Caracterización preliminar

4.2.2.1. Espectrometría de masas (EM)

Los resultados por EM realmente verifican que la proteína purificada corresponde al dominio de unión a ligando. El tratamiento con tripsina da lugar a fragmentos cuyo peso molecular se compara con bases de datos del NCBI asignando correspondencia con LR1-7. La masa total confirma que la proteína purificada corresponde a LR1-7. Por otro lado, tanto la incubación con VP como con AEMTS, resultó sin diferencias respecto a la muestra purificada sin tratar, lo que se traduce, en la ausencia de cisteínas libres en la proteína.

{MATRIX} Mascot Search Results

Protein View

Match to: LDLR_HUMAN Score: 106 Expect: 1.3e-005
Low-density lipoprotein receptor OS=Homo sapiens GN=LDLR PE=1 SV=1
Found in search of D:\T2D Data Ak266\2011\Octubre 2011\D032 051011\ppw_A16_131780563012.txt

Nominal mass (M_0): 98906; Calculated pI value: 4.86
NCBI BLAST search of [LDLR_HUMAN](#) against nr
Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Homo sapiens](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
Sequence Coverage: 13%

Matched peptides shown in **Bold Red**

Start	End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	Miss Sequence
27	38	1570.7338	1569.7265	1569.6300	0.0965	1 R.CERNEFQCQDGK.C (No match)
30	38	1125.5184	1124.5111	1124.4557	0.0555	0 R.NEFQCQDGK.C (No match)
30	38	1125.5184	1124.5111	1124.4557	0.0555	0 R.NEFQCQDGK.C (ions score 32)
30	43	1776.8595	1775.8522	1775.7607	0.0915	1 R.NEFQCQDGKISYK.W (No match)
70	78	942.4235	941.4162	941.3661	0.0500	0 K.SGDFSCGGR.V (No match)
70	78	942.4235	941.4162	941.3661	0.0500	0 K.SGDFSCGGR.V (ions score 60)
70	81	1311.6588	1310.6515	1310.5786	0.0729	1 K.SGDFSCGGRVNR.C (No match)
82	88	1006.5530	1005.5457	1005.4855	0.0603	0 R.CIEQFWR.C (No match)
108	115	1042.4977	1041.4904	1041.4186	0.0719	0 K.TGSGDFR.C (No match)
125	132	1026.4869	1025.4796	1025.4237	0.0560	0 R.QFVCDSDR.D (No match)
216	225	1151.5430	1150.5357	1150.4383	0.0974	1 R.CDGGPDCDK.S (No match)

Figura 4.24: Resultados de la espectrometría de masas demuestran que la proteína purificada es realmente la correspondiente a los módulos LR1-7.

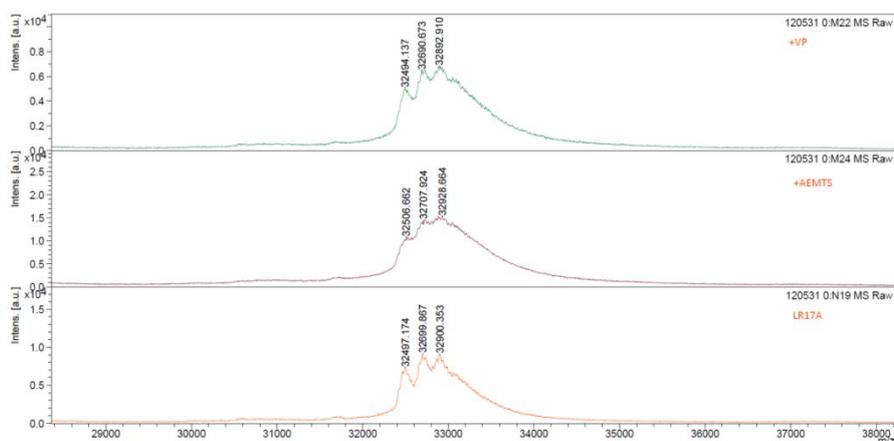


Figura 4.25: Resultados de EM muestran que no se encuentran cisteínas libres en la proteína purificada, al no verse aumentada su masa tras la incubación con VP y AEMTS. Se obtienen tres picos distintos porque la señal de exportación de la proteína al exterior de la célula puede procesarse en tres sitios indistintamente (anexo II)

Estabilidad e interacciones del dominio de unión del receptor de LDL

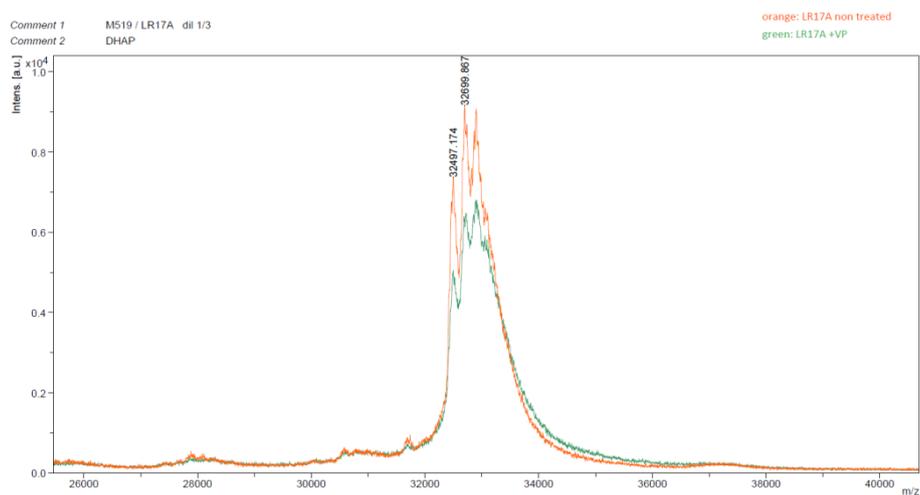
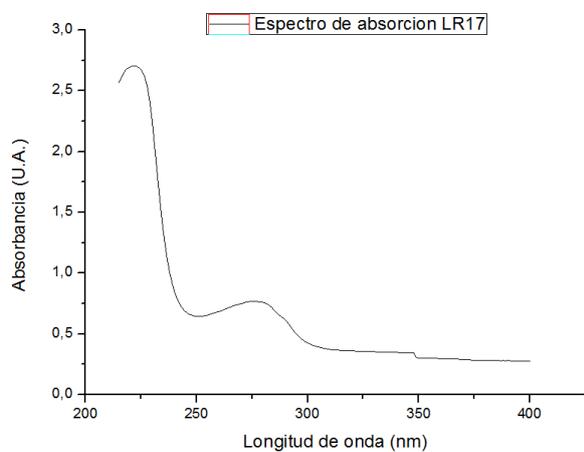


Figura 4.26: Superposición de los resultados de la proteína tratada con VP con la proteína sin tratar. No se observan diferencias en la relación m/z entre ellas.

4.2.2.2. Caracterización espectroscópica

Caracterización mediante Absorbancia UV-visible.



En el espectro de la figura 4.27, se observa un pico de absorción a 280 nm, correspondiente a los residuos aromáticos presentes en la proteína y principalmente del triptófano. También se observa la fuerte absorción del enlace peptídico que presenta su máximo en torno a los 225 nm.

Figura 4.27: Espectro de absorción de LR17 con un máximo a 280 nm, característico de los residuos aromáticos, y a 225 nm, el pico del enlace peptídico

- Caracterización por fluorescencia

En la caracterización por fluorescencia, se observa en primer lugar el espectro completo de emisión (300-800 nm). Presenta un pico máximo a una longitud de onda de 350 nm que corresponde a la señal proveniente

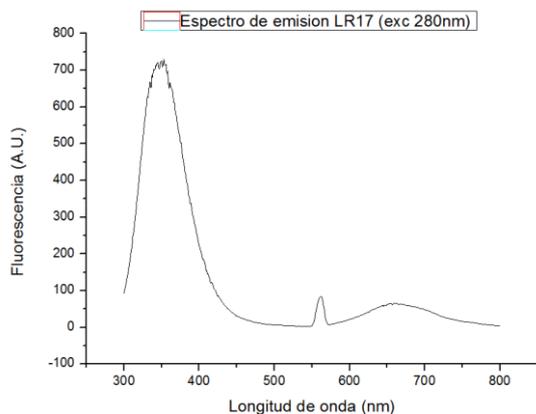


Figura 4.28: Espectro de emisión de LR17 con su máximo a 350 nm correspondiente a los residuos de Triptófano presentes en la proteína.

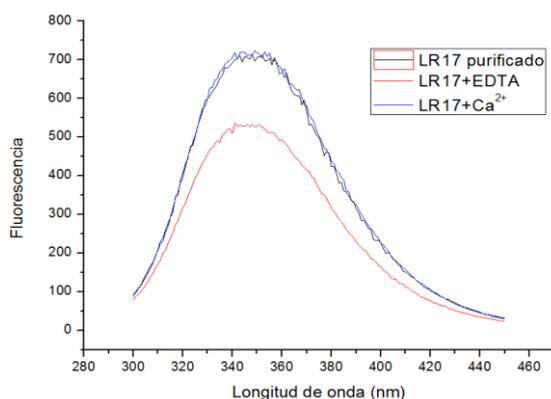


Figura 4.29: Espectros de emisión de LR17. En negro, emisión de los Trp presentes, rojo, espectro tras la adición de EDTA, y en azul señal tras la adición posterior de Ca^{2+} . Ensayos realizados en Pipes 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.

de los residuos de triptófano (Trp) presentes en la proteína.

Por otro lado, en la figura 4.29 se muestran los primeros ensayos de unión a Ca^{2+} realizados con la proteína purificada. Por un lado, al igual que en la figura 4.28 se observa la emisión de los triptófanos de la proteína purificada (negro). Tras la adición de EDTA, que quela el Ca^{2+} que se

encontraba unido a la proteína pura, se observa una disminución de la señal como consecuencia del cambio de conformación y entorno de los residuos de triptófano (rojo). Por último, la posterior adición de Ca^{2+} provoca un aumento de la intensidad hasta valores similares a los obtenidos inicialmente

en los que la proteína pura también tenía Ca^{2+} unido.

4.2.2.3 Desnaturalizaciones térmicas seguidas por fluorescencia

Los resultados correspondientes a las desnaturalizaciones térmicas seguidas por fluorescencia a pH 7 y pH 5.5 se muestran en las figuras 4.30 y 4.31. En ambas se muestra la bajada de fluorescencia como consecuencia del cambio de entorno de los residuos aromáticos y el apantallamiento de la señal por parte del solvente. El cálculo de las constantes termodinámicas de los procesos resulta altamente complicado debido a la baja cooperatividad existente entre los módulos. Estos datos podrán determinarse cuando se realicen análisis

Estabilidad e interacciones del dominio de unión del receptor de LDL

complementarios mediante otras técnicas (dicroísmo circular, calorimetría...) y se realice un ajuste global de todo ellos.

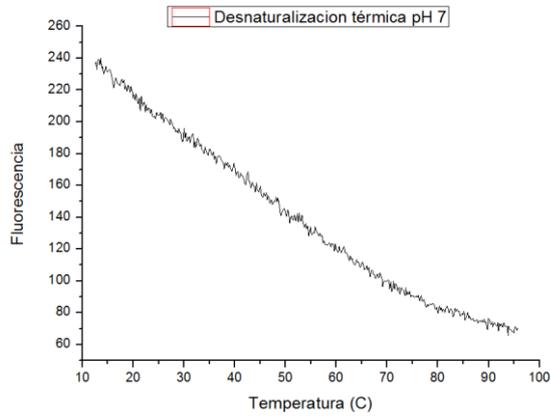


Figura 4.30: Desnaturalización térmica de LR17 en Pipes 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.

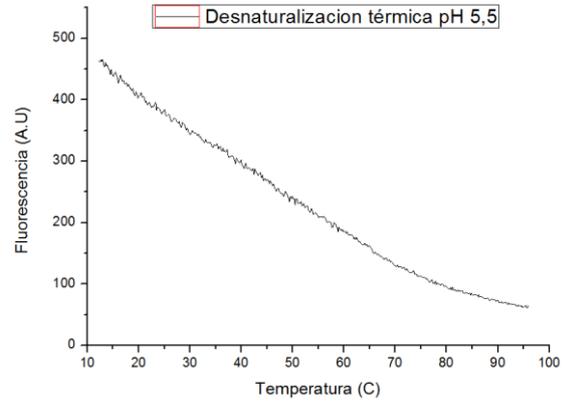


Figura 4.31: Desnaturalización térmica de LR17 en Acetato 10 mM, NaCl 150 mM, pH 5.5.

CAPÍTULO 5

Discusión

5.1. Unión de cationes a LR4, LR5 y LR4-5

5.1.1. LR5

Los resultados reflejan grandes diferencias en los valores de k_{on} obtenidos para el Ca^{2+} y Mg^{2+} , presentando LR5 una k_{on} notablemente superior para el Ca^{2+} y con un cambio más notorio en condiciones endosomales. . Esto puede deberse al mayor valor de entalpía de desolvatación para el Mg^{2+} , que al ser más pequeño, requiere más energía para arrebatarse las moléculas de agua con las que se coordina.

LR5 presenta similar k_{off} para los dos iones, presentándose cambios más notorios en función del pH. Esto refleja como era previsible aunque no estaba confirmado, que ambos comparten el mismo centro de unión a cationes, coordinándose con seis residuos de LR5, lo cual resulta novedoso ya que el Mg^{2+} es capaz de adoptar también una configuración coordinándose con 8 residuos. Los resultados obtenidos del proceso de disociación con LR5 y con el resto de módulos, confirman también la hipótesis inicial que sostiene que en los ensayos de disociación el EDTA no quela el Ca^{2+} o Mg^{2+} unido a la proteína sino el que se encuentra libre en disolución, ya que no las k_{off} no varían con la concentración de EDTA.

Todos los resultados anteriores han permitido el cálculo de la constante de equilibrio de disociación, K_D , que refleja la afinidad del módulo por cada uno de los cationes. LR5 presenta alta afinidad por el Ca^{2+} tanto a pH 7 ($K_D= 0.54 \mu M$) como a pH 5.5 ($K_D= 0.98 \mu M$) tal como se conocía de la caracterización termodinámica*.

La cinética nos muestra que los procesos de asociación y disociación, en general, son muy rápidos si se comparan con el tiempo de internalización y liberación de las LDL (20 min aproximadamente) por lo que, en condiciones endosomales, la sustitución del Ca^{2+} por Mg^{2+} en LR5 podría producirse sin que fuera necesaria la liberación de las LDL

5.1.2. LR4

Una diferencia clara extraída de los resultados del módulo LR4 respecto a LR5, viene dada por la baja afinidad que el primero presenta por Ca^{2+} a ambos pH (LR4 168 μM , LR5 0.54 μM a pH 7; LR4 302 μM , LR5 0.98 μM a pH 5.5). Los resultados se han comprobado y validado mediante otras técnicas (fluorescencia e ITC) y además, se ajustan a los obtenidos por otros grupos de investigación*.

Si se comparan los valores de k_{off} obtenidos para este módulo, se observa que éstos no muestran grandes diferencias entre pH extracelular y endosomal.

Otra diferencia importante a tener en cuenta respecto a LR5 es que, a pesar de su similitud con el Ca^{2+} , LR4 no une Mg^{2+} . Al realizar los ensayos, no se observaron curvas de asociación ni disociación que reflejasen dicha interacción. Si se aplican estos resultados al mecanismo de liberación de las LDL, LR4 perdería el Ca^{2+} en el endosoma pero no podría reemplazarlo por Mg^{2+} lo que conduciría a la pérdida de su estructura y favorecería la liberación de las LDL.

Comparando los resultados obtenidos entre LR4 y LR5, resulta notorio que dos módulos tan parecidos entre sí, presenten tantas diferencias a la hora de discriminar entre Ca^{2+} y Mg^{2+} . Por este motivo, se están llevando en nuestro grupo estudios de dinámica molecular que traten de explicar las grandes diferencias observadas en los dos módulos, muy similares y con centros de unión de cationes tan homólogos, que sólo se diferencian en la sustitución de una glicina en LR5 por un aspártico en LR4.

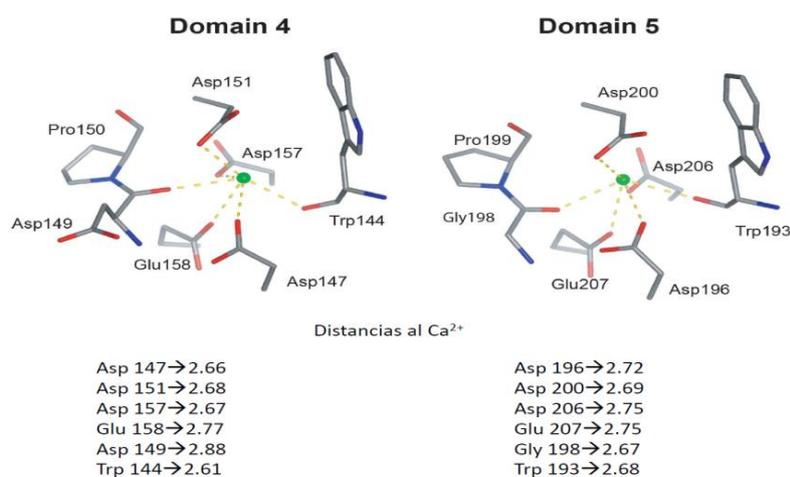


Figura 4.32: Diferencias estructurales entre los centros de coordinación de LR4 y LR5 con los cationes. La diferencia principal reside en un ácido aspártico en la posición 149 en LR4, respecto a la glicina presente en LR5. Figura realizada con el programa Pymol.

5.1.3. LR4-5

Los ensayos cinéticos de disociación de LR4-5 con Ca^{2+} muestran la independencia de los cada uno de los módulos respecto al otro, al obtenerse valores de k_{off} similares a la de los módulos por separado. Por otro lado la gran diferencia de afinidades entre LR4 y LR5 por separado dificulta el análisis de los datos en las curvas de asociación aunque también parece que siguen un comportamiento independiente. Todas las curvas realizadas para LR4-5- Ca^{2+} se ajustaron a un ecuación biexponencial reflejando que existen dos centros de coordinación con el catión.

Por otro lado, los ensayos de asociación y disociación de LR4-5- Mg^{2+} a pH 5.5 se ajustaron a una ecuación monoexponencial demostrando de nuevo, que LR4 es incapaz de unir Mg^{2+} . De la misma forma este ensayo comprobó de nuevo la independencia existente entre los módulos al obtenerse unos valores de constantes cinéticas similares a los de LR5 ($k_{\text{on LR5}} = 0.050 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, $k_{\text{off LR4-5}} = 0.052 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$).

El hecho de que los módulos se comporten de una manera independiente entre sí, implica que, la ganancia o pérdida de Ca^{2+} por uno de ellos no afectaría al otro. Esto quiere decir que la desestructuración de LR4 como consecuencia de la pérdida de Ca^{2+} , no sería motivo de cambio de conformación de LR5 que sí puede coordinarse con Mg^{2+} en el endosoma.

Los ensayos cinéticos llevados a cabo en este proyecto resultan una aportación novedosa en el entendimiento de las interacciones y afinidades entre los cationes y los módulos LR, que en algunos casos han sido complementados con estudios termodinámicos como fluorescencia o ITC. Por este motivo, la validación y complementación de los datos anteriores será objeto de un próximo artículo de investigación

5.2. Purificación y caracterización LR1-7

La purificación de LR1-7 expresado en células de *Pichia pastorys* es un proceso laborioso que se encuentra en proceso de optimización en nuestro laboratorio. Se trata de una proteína que no puede obtenerse en sistemas más sencillos como *E.coli* ya que contiene 21 puentes disulfuro entre otros inconvenientes. Es la primera vez que se lleva a cabo la purificación de este dominio completo del rLDL, representando un exitoso trabajo de obtención de una proteína tan compleja. Esto permitirá realizar numerosos trabajos futuros como su unión a las LDL, cristalización, etc.

La caracterización preliminar llevada a cabo demuestra que, al igual que los módulos por separado, LR1-7 es capaz de unir de nuevo Ca^{2+} tras retirar el que se encontraba unido a la proteína con EDTA. Aun así, queda pendiente la caracterización completa de las interacciones del dominio mediante ensayos calorimétricos o titulaciones seguidas por fluorescencia entre otros, que permitan determinar los valores de las K_D y la estequiometría con Ca^{2+} y Mg^{2+} .

Por otro lado, las curvas de desnaturalización térmica muestran la baja cooperatividad existente entre los módulos, indicando una vez más que estos actúan de forma independiente unos de otros, lo cual resulta importante para entender el comportamiento del rLDL durante todo el ciclo de internalización de las LDL. Sin embargo, este hecho por otro lado, dificulta enormemente el cálculo de parámetros termodinámicos, así como de la temperatura media de desnaturalización (T_M) de este proceso tanto a pH extracelular como endosomal. Aun así se seguirá trabajando mediante estudios de dicroísmo circular, desnaturalizaciones químicas seguidas por fluorescencia y calorimetría diferencial de barrido que, a través de un ajuste global de todos ellos, permitirán el cálculo de todos estos parámetros.

CAPÍTULO 6

Conclusiones

Las conclusiones más importantes que se derivan de todo el trabajo realizado son:

1. LR5 une presenta una k_{on} notablemente superior para Ca^{2+} que para Mg^{2+} a ambos pH
2. Los valores de k_{off} no presentan diferencias entre cationes en LR5
3. LR4 une débilmente Ca^{2+} comparado con la unión a LR5, y no es capaz de unir Mg^{2+} . La unión es más fuerte a pH 7.
4. LR4-5 presenta dos centros de coordinación con el Ca^{2+} que se comportan de forma independiente, y uno solo para el Mg^{2+} .
5. LR17 puede expresarse y purificarse en estado nativo en células de *Pichia pastorys*
6. LR17 es capaz de unir Ca^{2+} y la desnaturalización térmica se caracteriza por la baja cooperatividad existente entre los módulos.

CAPÍTULO 7

Bibliografía

- [¹] Nelson, D.L., and Cox, M.m (2006) Lehninger. Principios de bioquímica., Book
- [²] A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Brown MS, Goldstein JL. Science* 1986 Apr 4; 232(4736): 34-37
- [³] Binding and degradation of low density lipoprotein by cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia, *J. Biol Chem* 249, 5153-5162
- [⁴] LDL receptor related protein 1: unique tissue specific functions revealed by selective gene knockout studies. Lillis, A.P., Van Duyn, L.B., Murphy-Ullrich, J.E. and Strickland, D.K. *Physiol Rev* 88, 887-918.
- [⁵] The low-density lipoprotein receptor: ligands, debates and lore. Rudenko G, Deisenhofer J. *Curr Opin Struct Biol.* 2003 Dec;13(6):683-9. Review
- [⁶] Atherogenic remnant lipoproteins: role for proteoglycans in trapping, transferring and internalizing. Mahley, R.W., and Huang, Y. (2007), *J. Clin Invest* 117, 94-98.
- [⁷] Lowering plasma cholesterol by raising LDL receptors. Brown, M.S., and Goldstein JL (2004), *Atheroscler Supply* 5, 57-59
- [⁸] Localization of low density lipoprotein receptors on plasma membrane of normal human fibroblasts and their absence in cells from a familial hypercholesterolemia homozygote. Anderson, R.G., Goldstein J.L and Brown, M.S. 1976, *Proc Natl Acad Sci USA* 73, 2434-2438.
- [⁹] The Metabolic and molecular bases of inherited disease. Goldstein J.L., Brown M.S. and Hobbs, H.H. Vol 2.
- [¹⁰] The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins. Sudhorf, T.T., Goldstein J.L., Brown M.S., and Rusell, D.W. *Science* 228, 815-822 (1985).
- [¹¹] Structure and physiologic function of the low-density-lipoprotein receptor. Hyseung Jeon and Stephen C. Blacklow. *Annu. Rev. Biochem.* 2005. 74: 535-62
- [¹²] Three dimensional structure of a cysteine-rich repeat from the low-density lipoprotein receptor. Daly, M.L., Scanlon, M.J., Djordjevic, J.T., Crohn, P.A., and Smith, R. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 6334-6338 (1995).

[13] Folding, calcium binding, and structural characterization of a concatemer of the first and second ligand-binding modules of the low-density lipoprotein receptor. Bieri S, Atkins AR, Lee HT, Winzor DJ, Smith R, Kroon PA. *Biochemistry*. 1998 Aug 4;37(31):10994-1002.

[14] Backbone dynamics of a module pair from the ligand-binding domain of the LDL receptor. Beglova N, North CL, Blacklow SC. *Biochemistry*. 2001 Mar 6;40(9):2808-15 at *Struct Biol*. 2001 Jun;8(6):499-504.

[15] Scrambled isomers as key intermediates in the oxidative folding of ligand binding module 5 of the low density lipoprotein receptor. Arias-Moreno X, Arolas JL, Avilés FX, Sancho J, Ventura S. *J Biol Chem*. 2008 May 16;283(20):13627-37.

[16] Molecular basis of familial hypercholesterolemia from structure of LDL receptor module. Fass. D., Blacklow, S., Kim P.S., and Berger, J.M (1997), *Nature* 388, 691-693.

[17] The role of a conserved acidic residue in calcium-dependent protein folding for a low density lipoprotein (LDL)-A module: implications in structure and function for the LDL receptor superfamily. Guo Y, Yu X, Rihani K, Wang QY, Rong L. *J Biol Chem*. 2004 Apr 16;279(16):16629-37. Epub 2004 Jan 27

[18] Domain map of the LDL receptor: sequence of homology with the epidermal growth factor precursor. Russell, D.W., Schneider, W.J., Yamamoto, T., Luskey, K.L., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1984), *Cell* 37; 577-585.

[19] The first epidermal growth factor-like domain of the low density lipoprotein receptor contains a noncanonical calcium binding site. Malby, S., Pichkering, R., Saha, S., Smallridge, R., Linse, S., and Downing, A.K. (2001). *Biochemistry* 40; 2555-2563.

[20] An extracellular beta-propeller module predicted in lipoprotein and scavenger receptors, tyrosine-kinases, epidermal growth factor precursor, and extracellular matrix components. Springer, T.A. (1998), *J.Mol Biol* 283; 837-862.

[21] Implications for familial hypercholesterolemia from the structure of the LDL receptor YWTD-EGF domain pair. Jeon H, Meng W, Takagi J, Eck MJ, Springer TA, Blacklow SC. *Nat Struct Biol*. 2001 Jun;8(6):499-504.

[22] 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reductase: a transmembrane protein of the endoplasmic reticulum with N-linked "high-mannose" oligosaccharides. Liscun, L., Cummings, R.D., Andeson, R.G., DeMartino, G.N., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1983), *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 7165-7169

[23] Analysis of a mutant strain of human fibroblasts with a defect in the internalization of receptor-bound low density lipoprotein. Brown, M.S. and Goldstein J.L. (1976). *Cell* 9; 663-678.

[24] The roles of receptor-associated protein (RAP) as a molecular chaperone for members of the LDL receptor family. Bu, G. (2001). *Int Rev Cytol* 209; 79-116

[25] Protein disulfide isomerase: the structure of oxidative folding. Gruber, C.W., Cemazar, M., Heras B., Martin J.L., and Craik D.J. (2006). *Trends Biochem Sci* 31; 455-464.

- [26] Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor-bound low density lipoprotein in human fibroblasts. Anderson, R.G., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1977). *Cell* 10; 351-164
- [27] Luminal chloride dependent activation of endosome calcium binding channels: Patch-clamp study of enlarged endosomes, Saito, M., Hanson, P.I., and Schlesinger, P (2007). *J Biol Chem*
- [28] Calcium uptake via endocytosis with rapid release from acidifying endosomes. Gerasimenko, J.V., Tepikin, A.V., Pertersen, O.H., and Gerasimenko, O.V. (1998), *Curr Biol* 8; 1335-1338.
- [29] The LDL receptor: how acid pulls the trigger. Natalia Beglova and Stephen C. Blacklow (2005). *Biochemical Sciences* Vol.30 No.6 309-317.
- [30] Structure of the LDL receptor extracellular domain at endosomal pH. Rudenko G, Henry L, Henderson K, Ichtchenko K, Brown MS, Goldstein JL, Deisenhofer J. (2002) *Science* 20;298 (5602):2353-8.
- [31] El módulo 5 del receptor de lipoproteínas de baja densidad: implicaciones mecánicas de su estabilidad, plegamiento e interacciones moleculares. Arias-Moreno X. Junio 2010.
- [32] Mechanism of low density lipoprotein (LDL) release in the endosome: implications of the stability and Ca²⁺ affinity of the fifth binding module of the LDL receptor. Arias-Moreno X, Velazquez-Campoy A, Rodríguez JC, Pocoví M, Sancho J. (2008) *J Biol Chem* 15;283(33):22670-9.
- [33] Thermodynamics of protein-cation interaction: Ca(+2) and Mg(+2) binding to the fifth binding module of the LDL receptor. Arias-Moreno X, Cuesta-Lopez S, Millet O, Sancho J, Velazquez-Campoy A. (2010) *Proteins* ;78(4):950-61.
- [34] Energetics of Ca²⁺-EDTA interactions: calorimetric study. Griko, Y.V. (1999). *Biophys Chem* 79; 117-127
- [35] Chelex®100 and Chelex 20 Chelating Ion Exchange Resin. Bio-Rad Laboratories, 2000 Alfred Nobel Dr.
- [36] Gel electrophoresis of proteins. David E.Garfin 197-268. *Essential Cell Biology* Volume 1
- [37] *Applied Photophysics SX.20 Stopped Flow Spectrometer*. Applied photophysics
- [38] *Comprehensive enzyme kinetics*. Vladimir Leskovac 2004. Kluwer Academic Publishers. ISBN: 0-306-48390-4.
- [39] Isothermal titration calorimetry. Velázquez-Campoy A, Ohtaka H, Nezami A, Muzammil S, Freire E.. (2004). *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 17: 17.8. Review.
- [40] The Structure, Dynamics, and Binding of the LA45 Module Pair of the Low-Density Lipoprotein Receptor Suggest an Important Role for LA4 in Ligand Release. Miklos Guttman and Elizabeth A. Komives (2011). *Biochemistry* 50; 11001-11008.

Estabilidad e interacciones del dominio de unión del receptor de LDL

LR45

VLTCGPASFQ CNSSTCIPQL WACDNDPDCE DGSDEWPQRC RGLYVFQGDS SPCSAFEFHC
70 80
LSGECIHSSW RCDGGPDCKD KSDEENCA

Número de aminoácidos: 88

Peso molecular: 9649.4

Formula: C₄₀₁H₅₈₉N₁₁₃O₁₄₂S₁₂

Número total de átomos: 1257

Coefficiente de extinción:

Los coeficientes de extinción están en unidades de M⁻¹ cm⁻¹, a 280 nm medidas en agua

Coefficiente de extinción 18740

Abs 0.1% (=1 g/l) 1.942, asumiendo que todos los residuos de Cys forman cistinas

Coefficiente de extinción 17990

Abs 0.1% (=1 g/l) 1.864, asumiendo que todas las Cys se encuentran reducidas

LR17

KREAEAAVGDR CERNE FQCQDGK CIS YKWVCDGSAE CQDGSDESQE TCLSVTCKSG DFSCGGRVNR
10 20 30 40 50 60
70 80 90 100 110 120
CIPQFWRC DG QVDCDNGSDE QGCPPKTCSQ DEFRCHDGKC ISRQFVCDS D RDCLDGSDEA
130 140 150 160 170 180
SCPVLTCGPA SFQCNSSTCI PQLWACDNDP DCEDGSDEWP QRCRGLYVFQ GDSSPCSAFE
190 200 210 220 230 240
FHCLSGECIH SSWRCDGGPD CKDKSDEENC AVATCRPDEF QCSGNCIHG SRQCDREYDC
250 260 270 280 290
KDMSDEVGC V NVTLCGPNK FKCHSGECIT LDKVCNMARD CRDWSDEPIK EC

Número de aminoácidos: 292

Peso molecular: 32298.3

Formula: C₁₃₁₄H₂₀₀₁N₃₉₃O₄₇₄S₄₄

Número total de átomos: 4226

Coefficientes de extinción:

Los coeficientes de extinción están en unidades de M⁻¹ cm⁻¹, a 280 nm medidas en agua

Coefficiente de extinción 40095

Abs 0.1% (=1 g/l) 1.241, asumiendo que todos los residuos de Cys forman cistinas

Coefficiente de extinción 37470

Abs 0.1% (=1 g/l) 1.160, asumiendo que todas las Cys se encuentran reducidas

ANEXO II

YPD-Agar

Yeast Extract Peptone Dextrose Medium (1 litro)

1. Disolver los siguientes componentes en 900ml de agua

10 g de extracto de levadura

182.2 g de sorbitol

20 g de peptona

2. Añadir 20 g de agar.

3. Autoclavar durante 20 minutos.

4. Añadir 100 ml de 10X D

5. Enfriar solución y añadir 1.0 ml de 100 mg/ml Zeocina.

Guardar las placas YPD-Agar más Zeocina a 4°C, **en oscuridad**. La vida media de las placas se encuentra entre 1-2 semanas.

BMGY BMMY

1. Disolver 10 g de extracto de levadura, 20 g peptona en 700 ml agua.

2. Autoclavar durante 20 minutos.

3. Enfriar a temperatura ambiente, y añadir la siguiente mezcla:

100 ml 1 M tampón fosfato de potasio, pH 6.0

100 ml de 0X YNB

2 ml 500X B

100 ml 10X glicerol

4. Para BMMY, añadir 100 ml 10X de metanol en lugar of glicerol.

5. Store media at 4°C. The shelf life of this solution is approximately two months.