



Burgardt, Noelia I.

Caracterización bioquímica y biofísica de la proteína transportadora de esteroides de la levadura *Yarrowia lipolytica*



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Burgardt, N. I. (2016). *Caracterización bioquímica y biofísica de la proteína transportadora de esteroides de la levadura Yarrowia lipolytica. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina*
Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes <https://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/184>

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Caracterización bioquímica y biofísica de la proteína transportadora de esteroides de la levadura *Yarrowia lipolytica*

TESIS DOCTORAL

Noelia I. Burgardt

niburga@unq.edu.ar

Resumen

Los lípidos cumplen roles importantes en diversas funciones biológicas a pesar de presentar una muy baja solubilidad en agua, el solvente principal de la vida. Los mecanismos celulares desarrollados para el manejo de los lípidos permiten la utilización de los mismos y mantienen la correcta homeostasis celular. En mamíferos, cualquier alteración en alguno de estos mecanismos puede producir patologías como diabetes, aterosclerosis y mal de Alzheimer, entre otras. Estudiar cómo las células manejan los lípidos es un paso importante en la comprensión de toda la fisiología y bioquímica celular.

El transporte intracelular mediado por las SLBP parece ser un mecanismo importante para la disolución y movilización intracelular de lípidos. Sin embargo, actualmente no está claro si las SLBP son indispensables para el correcto funcionamiento celular. Las distintas SLBP difieren en su estructura, filogenia, localización tisular e intracelular y espectro de unión de ligandos, presentando un panorama complejo para la interpretación de las funciones de estas proteínas. Sin embargo, entre las SLBP podemos encontrar una familia con propiedades que abarcan las de todos los integrantes: las proteínas transportadoras de esteroides (SCP2).

Las SCP2 unen un amplio grupo de lípidos incluyendo los ligandos de todas las SLBP y son las únicas presentes en todos los reinos biológicos. Esta familia de proteínas ha sido estudiada mayormente en mamíferos, organismos donde se expresan otras SLBP y otras enzimas multidomínios que poseen uno o más dominios SCP2.

Un sistema alternativo para el estudio del metabolismo de lípidos es la levadura *Yarrowia lipolytica*, la cual posee una alta capacidad de consumo de compuestos hidrofóbicos. Nuestro laboratorio identificó y aisló la proteína transportadora de esteroides de *Yarrowia lipolytica* (YLSCP2), la cual es la única SLBP presente en el microorganismo. Estas características hacen de YLSCP2 un excelente modelo para el estudio de la familia de proteínas transportadoras de esteroides.

El objetivo general de este trabajo de tesis es completar una caracterización estructural, termodinámica y funcional de YLSCP2, buscando esclarecer el mecanismo funcional de las SCP2. Los objetivos específicos son la caracterización biofísica, la determinación de la unión de diversos ligandos hidrofóbicos y el estudio del efecto de la unión de dichos ligandos sobre la estructura y la estabilidad de la proteína.

Para alcanzar estos objetivos fueron diseñados un sistema de expresión recombinante de YLSCP2 en *E.*

coli y un protocolo para obtener YLSCP2 en grandes cantidades y alta pureza. A partir de los resultados de los espectros de absorción UV, de dicroísmo circular, fluorescencia, FPLC y SAXS pudo determinarse que la proteína se encuentra correctamente plegada.

La estabilidad de YLSCP2 en función del pH demuestra que esta proteína es más estable a pH básico que a pH ácido. En el desplegado de YLSCP2 inducido por el agregado de urea se observaron al menos tres transiciones.

YLSCP2 puede unir con alta afinidad ácido *cis*-parinárico (AP), ácido palmítico (PAL), palmitoil-Coenzima A (pCoA), 1,2-dipalmitoil-sn-glicerol (DPG), fosfatidil colina de huevo (EPC), dehidroergosterol (DHE), ácido 1-anilinaftalen-8-sulfónico (ANS) y merocianina-540 (MC). La unión de los ligandos fue determinada mediante diferentes técnicas, dependiendo de las propiedades de cada ligando. Además fue demostrado que YLSCP2 interacciona con vesículas lipídicas.

El presente trabajo de tesis fue realizado principalmente en el Laboratorio de Expresión y Plegado de Proteínas (LEPP), Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes y en el laboratorio de Biofísicoquímica del Instituto de Investigaciones Físico-Químicas Teóricas y Aplicadas de la Universidad Nacional de La Plata.

Publicaciones

Parte de los resultados presentados en esta tesis forman parte de las siguientes publicaciones:

- Raúl G. Ferreyra, Noelia I. Burgardt, Daniel Milikowski, Gustavo Melen, Alberto R. Kornblihtt, Esteban C. Dell 'Angelica, José A. Santomé, Mario R. Ermácora. "*A yeast sterol carrier protein with fatty-acid and fatty-acyl-CoA binding activity*", Archives of Biochemistry and Biophysics, 453: 97-206 (2006).
- Lisandro J. Falomir-Lockhart, Noelia I. Burgardt, Raúl G. Ferreyra, Marcelo R. Ceolín, Mario R. Ermácora, Betina Córscico. "*Collision-mediated transfer of fatty acids from Yarrowia lipolytica sterol carrier protein-2 to phospholipid membranes*", Biophysical Journal, 97(1): 248-56 (2009).
- Noelia I. Burgardt, Raúl G. Ferreyra, Lisandro J. Falomir-Lockhart, Betina Córscico, Mario R. Ermácora, Marcelo R. Ceolín. "*Biophysical characterisation and urea-induced unfolding of recombinant Yarrowia lipolytica sterol carrier protein-2*", Biochimica et Biophysica Acta (BBA), 1794(8): 1115-22 (2009).
- Noelia I. Burgardt; Federico J. Pérez De Berti, Raúl G. Ferreyra; Betina Corsico; Mario R. Ermácora; Marcelo R. Ceolín. "*Conformational and structural changes induced by ligand binding in Yarrowia lipolytica sterol carrier protein-2*", manuscrito en preparación.

Agradecimientos

- Al Dr. Marcelo R. Ceolín.
- Al Dr. Mario R. Ermácora.
- Al Dr. Raúl G. Ferreyra.
- A Daniel Milikowski.
- A los integrantes del laboratorio de la Dra. Betina Córscico, especialmente al Dr. Lisandro Falomir Lockhart.
- Al Dr. Javier Santos.
- Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).
- A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT)
- Al Laboratorio Nacional de Luz Sincrotrón (LNLS), Campinas, Brasil.
- A la Universidad Nacional de Quilmes (UNQ).

Dedicatorias

A mamá y papá, porque a ellos les debo todo lo que soy.

A Javi, Angie y Ale, por toda la alegría que me dan.

A Manu, porque tu amor ilumina mi vida. A Adri y Cari, por su amistad incondicional.

A Sebastián, mi ahijado, el más lindo de todos. A todos mis familiares y amigos, los pasados, los presentes y los futuros.

A Marcelo y Mario, por entrenarme en la ciencia y en la vida. A Eri, Leopold, Javi, Dany y

Euge, los ex-LEPP que me abrieron las puertas.

A Raúl, Fede, Gabi, Julian y Ale, los mejores amigos y compañeros que se puede tener.

A los integrantes del laboratorio de Betina y de Marcelo.

A todo el LEPP en formato fasta:

>LEPP

EUGENIACLERICOCECILIAFRATESERGIOPEISAJOVICHUMBRACOLOMBODANI
ELMILIKOWSKIERICAANTONJAVIERSANTOSCRISTINAMARINOMAUROSIC
AFEDERICOCARRIZOLEOPOLDGEBHARDPAULOMAFFIACECILIAZANEKANAST
ERNVALERIARISSOANACLAUDIAFLORESNOELIABURGARDTFRANCISCOOLIVE
RARAUFLERREYRAMARTINNOGUERAGABRIELATORCHIOFEDERICOPEREZDEBE
RTIINESHIRIARTEALEJANDROSANCHEZJULIANBONETTOJUANPABLOACIERN
ODIEGOFERREIRODANIELATELESCA

Abreviaturas

acil-CoA	ácidos grasos modificados con Coenzima A
ADN	ácido desoxirribonucleico
ANS	ácido 1-anilinaftalen-8-sulfónico
AP	ácido cis-parinámico
ASA	superficie accesible al solvente
CD	dicroísmo circular
CI	cuerpos de inclusión (fracción insoluble)
CMC	concentración micelar crítica
CP	capacidad calorífica a presión constante
DE	desvío estándar
DHE	dehidroergosterol
DMSO	dimetilsulfóxido
dNTP	desoxinucleótidos trifosfato
DO ₆₀₀	densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm
DPG	1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicerol
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
EPC	fosfatidil colina de huevo
ϵ	coeficiente de extinción molar
FPLC	cromatografía rápida líquida de proteínas y péptidos
FRET	transferencia de energía de resonancia Förster
GuHCl	cloruro de guanidinio
I_{C50}	concentración media de desplazamiento
IPTG	β -D-isopropil-tiogalactósido
ITC	calorimetría de titulación isotérmica
K_D	constante de disociación
LB	medio de cultivo Luria-Bertani
MC	merocianina-540
MW	marcador de peso molecular
NATA	N-acetiltryptofanoamida
NAYA	N-acetiltryrosinamida
NBD	4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol
PAL	ácido palmítico
pCoA	palmitoil-Coenzima A
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDB	Banco de datos de proteínas pI punto isoeléctrico
P_R	función de densidad de pares de distancias
PST1	señal de direccionamiento a peroxisomas tipo 1
R_G	radio de giro

RMN	resonancia magnética nuclear
RMSD	desplazamiento cuadrático medio rpm revoluciones por minuto
<i>RS</i>	radio de Stokes
SAXS	dispersión de rayos-X a bajo ángulo
SEC	cromatografía de exclusión molecular
SCP2	proteína transportadora de esteroides tipo-2
SDS	dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
SLBP	proteínas solubles que unen lípidos
SUV	vesículas unilamelares pequeñas
<i>T_m</i>	temperatura media de desnaturalización
UV	ultravioleta
YLSCP2	proteína transportadora de esteroides tipo-2 de <i>Yarrowia lipolytica</i>

Aminoácidos

Ala	A	alanina
Arg	R	arginina
Asn	N	asparagina
Asp	D	ácido aspártico
Cys	C	cisteína
Gln	Q	glutamina
Glu	E	ácido glutámico
Gly	G	glicina
His	H	histidina
Ile	I	isoleucina
Leu	L	leucina
Lys	K	lisina
Met	M	metionina
Phe	F	fenilalanina
Pro	P	prolina
Ser	S	serina
Thr	T	treonina
Trp	W	triptofano
Tyr	Y	tirosina
Val	V	valina

Índice de contenido

Publicaciones

Agradecimientos

Dedicatorias

Abreviaturas

Aminoácidos

Capítulo I: INTRODUCCIÓN GENERAL

1. El manejo celular de lípidos
 - 1.I. Ingreso de lípidos a la célula
 - 1.II. Transporte intracelular
 - 1.III. Catabolismo de lípidos
2. *Yarrowia lipolytica*: alta eficiencia en utilización de lípidos
 - 2.I. Contacto entre las células y el sustrato
 - 2.II. Obtención y transporte de los sustratos hidrofóbicos
 - 2.III. Oxidación primaria de *n*-alcanos
 - 2.IV. Degradación de ácidos grasos por β -oxidación
 - 2.V. Acumulación de lípidos
3. Objetivos de la tesis

Capítulo II: CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE YLSCP2

1. Introducción
 - 1.I. La familia de genes SCP2
 - 1.II. Características estructurales de SCP2
 - 1.III. Objetivos para la caracterización estructural de YLSCP2
2. Resultados
 - 2.I. Producción de YLSCP2
 - 2.II. Espectroscopia UV-VIS
 - 2.III. Contenido de estructura secundaria
 - 2.IV. Contenido de estructura terciaria
 - 2.V. Estado de agregación
 - 2.VI. Análisis bioinformático
3. Discusión

Capítulo III: CARACTERIZACIÓN TERMODINÁMICA DE YLSCP2

1. Introducción
 - 1.I. La estabilidad de las proteínas
 - 1.II. La estabilidad de las SCP2

- 1.III. Objetivos para la caracterización termodinámica de YLSCP2
2. Resultados
 - 2.I. Estabilidad estructural de YLSCP2
 - 2.II. Desplegado de YLSCP2 inducido por temperatura
 - 2.III. Estabilidad química de YLSCP2
3. Discusión

Capítulo IV: CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE YLSCP2

1. Introducción
 - 1.I. Perfil de unión de ligandos de SCP2
 - 1.II. Transferencia de lípidos mediada por SCP2
 - 1.III. Relación estructura-función
 - 1.IV. Objetivos para la caracterización funcional de YLSCP2
2. Resultados
 - 2.I. Unión de ligandos
 - 2.II. Interacción de YLSCP2 con membranas
 - 2.III. Efecto de la unión de ligandos sobre YLSCP2
3. Discusión

Capítulo V: CONCLUSIONES

1. Caracterización de YLSCP2
 - 1.I. Aspectos estructurales
 - 1.II. Estabilidad
2. Análisis funcional de YLSCP2
 - 2.I. Perfil de afinidad
 - 2.II. Interacción con membranas
 - 2.III. Efecto de la unión de ligandos
3. YLSCP2: modelo para el estudio de las SCP2
 - 3.I. Análisis biofísico de YLSCP2
 - 3.II. Transferencia de ligandos a membranas mediada por YLSCP2
 - 3.III. Ensayos de la función *in-vivo* de YLSCP2
4. Perspectivas

Capítulo VI: MATERIALES Y MÉTODOS

1. Biología Molecular
 - 1.I. *Yarrowia lipolytica* CX-121-1B
 - 1.II. Purificación de ADN de *Y. lipolytica*
 - 1.III. Amplificación del gen de YLSCP2

- 1.IV. Secuenciación de ADN
- 1.V. Electroforesis en geles de agarosa
- 1.VI. Purificación de ADN de geles de agarosa
- 1.VII. Digestión de ADN
- 1.VIII. Ligación de ADN
- 1.IX. Producción de bacterias competentes
- 1.X. Transformación de bacterias *E. coli* JM109
- 1.XI. Purificación de ADN plasmídico
- 1.XII. Transformación de bacterias *E. coli* BL21(DE3)
- 2. Expresión y purificación de YLSCP2
 - 2.I. Expresión de YLSCP2 en *E. coli* BL21(DE3)
 - 2.II. Electroforesis en geles de poliacrilamida
 - 2.III. Determinación de la localización de YLSCP2
 - 2.IV. Obtención de cuerpos de inclusión
 - 2.V. Purificación
 - 2.VI. Espectrometría de masa y secuenciación de proteínas
- 3. Caracterización estructural de YLSCP2
 - 3.I. Determinación de la concentración de proteína
 - 3.II. Espectroscopia de Absorción-UV
 - 3.III. Espectroscopia de Dicroísmo Circular
 - 3.IV. Espectroscopia de Fluorescencia
 - 3.V. Atenuación de la fluorescencia de triptofano
 - 3.VI. Anisotropía de fluorescencia de triptofano
 - 3.VII. Comportamiento hidrodinámico
 - 3.VIII. Dispersión de rayos-X a bajo ángulo
 - 3.IX. Entrecruzamiento
 - 3.X. Bioinformática
- 4. Caracterización termodinámica de YLSCP2
 - 4.I. Desnaturalización inducida por temperatura
 - 4.II. Desnaturalización inducida químicamente
- 5. Caracterización Funcional de YLSCP2
 - 5.I. Modelo para un sitio de unión
 - 5.II. Unión de ligandos fluorescentes
 - 5.III. Desplazamiento de ácido *cis*-parináico
 - 5.IV. Unión de ligandos seguida por atenuación de la fluorescencia
 - 5.V. Cambios de Anisotropía debidos a la unión de ligandos

- 5.VI. Unión de ligandos seguida por ITC
- 5.VII. Interacción con vesículas unilamelares pequeñas
- 5.VIII. Efecto de la unión de ligandos en la estructura de YLSCP2
- 5.IX. Efecto de la unión de ligandos en la estabilidad de YLSCP2

Bibliografía

Capítulo I

INTRODUCCIÓN GENERAL



1. El manejo celular de lípidos

Los lípidos participan en funciones biológicas esenciales, como el almacenamiento de energía (triglicéridos), composición estructural de membranas (fosfolípidos y esteroides), hormonas (testosterona, estradiol, cortisol, prostaglandinas, etc.), vitaminas (vitamina A, D, E y K), pigmentos (clorofilas, xantonas y carotenos), transducción de señales (derivados de ácidos grasos poli-insaturados y fosfolípidos) y transporte de electrones (ubiquinona y plastoquinona). La característica en común de todos ellos, su baja solubilidad en agua, presenta una gran dificultad para la utilización de los mismos por los organismos vivos.

Los seres vivos obtienen lípidos mediante síntesis endógena o los incorporan a partir de la dieta. Existen varios mecanismos que promueven la obtención, retención, transporte intracelular y utilización de estas biomoléculas. El ingreso de lípidos en las células implica una sucesión de varios pasos, los cuales pueden ser mediados por difusión o por mecanismos facilitados por proteínas (Figura 1). Una vez dentro de la célula, los lípidos deben mantenerse solubles y, en las células eucariotas, deben ser transportados hacia organelas. Finalmente, estos compuestos hidrofóbicos pueden ser metabolizados mediante diversos procesos como por ejemplo la β -oxidación de ácidos grasos.

1.1. *Ingreso de lípidos a la célula*

El ingreso de los lípidos a las células puede dividirse en 3 pasos: (I) absorción a la membrana celular, (II) desplazamiento a través de la membrana y (III) disociación en el citoplasma (Figura 1) [1].

1.1. a. *Absorción*

En el caso de la transferencia espontánea de compuestos hidrofóbicos a membranas, la alta partición de los lípidos a favor de las membranas fosfolipídicas enriquece su concentración en las bicapas en comparación con el medio acuoso. La constante de velocidad para la absorción de monómeros de ácidos grasos en vesículas de bicapas fosfolipídicas es muy grande. La velocidad de unión está limitada por la difusión, dependiendo de la concentración de lípidos monoméricos y de la concentración de lípido en la membrana [2]. Existen diversos mecanismos biológicos para aumentar la concentración extracelular de lípidos. Por ejemplo, los mamíferos poseen proteínas plasmáticas (albúminas) que unen lípidos y los transportan por el organismo. Por otro lado, algunos microorganismos liberan sustancias emulsificantes que disuelven los lípidos extracelulares. De esta forma, los organismos producen un aumento en la concentración extracelular de lípidos monoméricos, los cuales pueden ser captados más fácilmente por

las células.

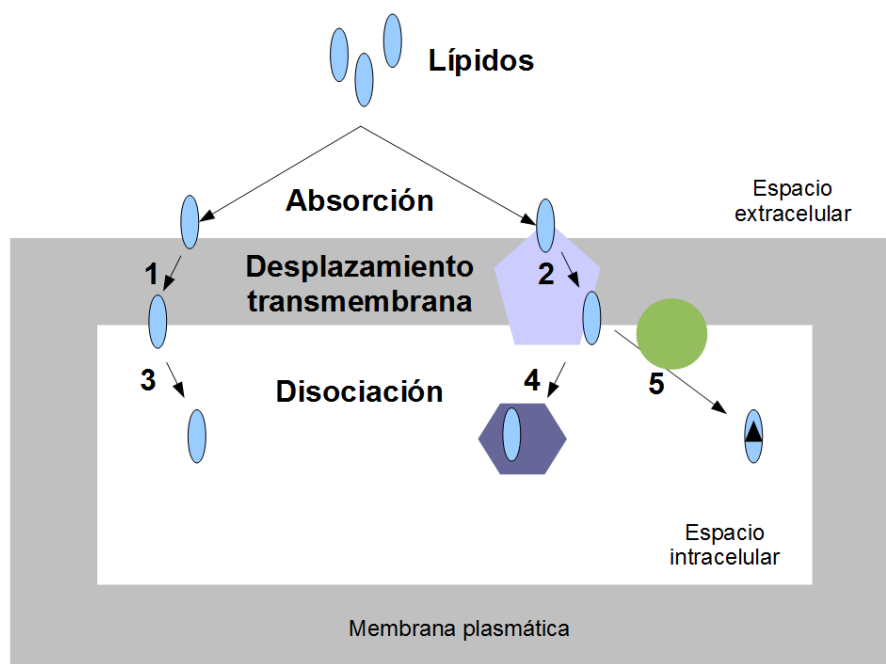


Figura 1. Esquema general del ingreso de los lípidos, indicando la absorción de los lípidos a la membrana celular, el desplazamiento a través de la membrana por difusión (1) y mediado por proteínas (2), y finalmente, la disociación en el citoplasma espontánea (3), por unión a proteínas transportadoras (4) o por modificaciones químicas como esterificación (5).

1.1.b. Desplazamiento a través de la membrana

Una vez que el lípido se encuentra en la cara extracelular de la membrana, el desplazamiento hacia la cara interna puede ocurrir por difusión pasiva o por mecanismos mediados por proteínas. Muchos ácidos grasos de cadena larga se desplazan rápidamente a través de una membrana de forma espontánea, con tiempos medios entre 20 ms y 2 s cuando su grupo carboxilo está protonado [3]. El pKa de los ácidos grasos en la membrana es cercano al pH fisiológico, de manera que aproximadamente un 50 % de las moléculas se encuentran en su forma no ionizada. Estas propiedades de ionización son la base del modelo para la difusión pasiva transmembrana de los ácidos grasos [3]. Según este modelo los ácidos grasos se unen rápidamente a la bicapa lipídica, donde se establece un equilibrio de ionización aumentando la población de ácidos grasos no ionizados hasta ~ 50 %. Luego, los ácidos grasos no ionizados se mueven rápidamente a través de la bicapa lipídica en respuesta a un gradiente de concentración. Finalmente, en la cara interna de la membrana la mitad de los ácidos grasos vuelven a ionizarse hasta alcanzar el equilibrio. Este mecanismo puede estudiarse siguiendo el cambio de pH en el

interior de una vesícula lipídica utilizando compuestos fluorescentes sensibles al cambio de pH [3].

En contraste con los ácidos grasos, algunos derivados metabólicos de ácidos grasos (acil-Coenzima A y acil-Carnitina) no pueden moverse espontáneamente a través de una bicapa fosfolipídica. La carga negativa de estos compuestos a pH fisiológico no es neutralizada en el ambiente lipídico, por lo que los mismos únicamente pueden ser desplazados a través de la membrana por proteínas especializadas.

El hecho de que los ácidos grasos pueden desplazarse espontáneamente en membranas no descarta la existencia de mecanismos mediados por proteínas que podrían coexistir con el mecanismo pasivo. El mecanismo espontáneo se vuelve menos eficiente cuando disminuye la concentración extracelular de lípido, condición en la que es indispensable el funcionamiento de proteínas transportadoras. En *E. coli* existe una proteína presente en la cara externa de la membrana que une y transporta lípidos, asociada a una proteína de la cara interna de la membrana que los esterifica. En mamíferos se conocen varias proteínas que pueden estar implicadas en el transporte de ácidos grasos de cadena larga. Entre ellas podemos mencionar a la proteína de membrana que une ácidos grasos (FABPpm), la transportadora de ácidos grasos (FAT o CD36), la proteína de transporte de ácidos grasos-1 (FATP1) y la sintetasa de acil-CoAs de cadena larga (ACS1).

1.I.c. Disociación

Una vez que el lípido se desplazó a la cara interna de la membrana celular, ocurre la disociación del mismo hacia el citoplasma, donde puede difundir espontáneamente, ser esterificado o ser transportado por proteínas citosólicas. Debido a la gran afinidad de los lípidos por membranas resulta evidente que la constante de velocidad de disociación es menor que la de asociación. Esta constante de velocidad de disociación depende del tamaño del lípido y es menor a la constante de desplazamiento a través de la membrana [1]. La esterificación de ácidos grasos está mediada por las sintetasas de cadena larga asociadas a membranas, facilitando la disociación del ácido graso y su retención intracelular.

1.II. Transporte intracelular

Al igual que la captación, desplazamiento y disociación de los lípidos en la membrana celular, el transporte intracelular de lípidos puede realizarse mediante mecanismos espontáneos y/o mediados por proteínas.

En el caso del tráfico intracelular espontáneo de ácidos grasos se han propuesto

cuatro mecanismos [4][5]: (I) transferencia mediante vesículas convencionales de transporte de proteínas a través de la vía secretoria, (II) transferencia por vesículas que no participan del transporte de proteínas por vía secretoria, (III) transferencia mediada por colisión entre organelas, y (IV) transferencia como monómeros a través del citosol.

Por otro lado, el movimiento de lípidos a través del citosol también puede estar facilitado por pequeñas proteínas citoplasmáticas, denominadas Proteínas Solubles de Unión de Lípidos (SLBP, *Soluble Lipid Binding Proteins*). Existen al menos cinco tipos de SLBP:

- proteínas transportadoras de ácidos grasos (FABP, *Fatty Acid Binding Proteins*) [5],
- proteínas transportadoras de acil-CoA (ACBP, *Acyl-CoA Binding Proteins*) [6],
- proteínas transportadoras de fosfolípidos (PLTP, *Phospholipid Transfer Proteins*) [7],
- proteínas transportadoras de lípidos no específicas (nsLTP, *nonspecific lipid transfer protein*) [8],
- proteínas transportadoras de esteroides (SCP2, *Sterol Carrier Proteins-2*) [9].

El espectro de lípidos que unen estas proteínas está especificado en su nombre, excepto en el caso de las SCP2, las cuales unen los ligandos de las PLTPs, FABPs y ACBPs además de esteroides y glicolípidos.

El perfil de expresión de las SLBP demuestra diferencias filogenéticas en la forma mediante la cual las células manejan los lípidos: las FABP sólo se encuentran en animales [10], las ACBP se encuentran en animales, plantas y levaduras [11], las PLTP se pueden encontrar en animales, plantas, levaduras y bacterias [12], las nsLTP sólo se encuentran en plantas [8] y las SCP2 son las únicas que pueden encontrarse en los tres reinos biológicos [13]. La importancia de estas SLBP para el metabolismo de lípidos todavía no ha sido esclarecida.

1.III. Catabolismo de lípidos

En los organismos eucariotas, la mayoría de los lípidos que ingresan en las células son transferidos a mitocondrias o peroxisomas para la producción de energía. En el caso de los ácidos grasos, el principal proceso de catabolismo es la β -oxidación. En animales la β -oxidación se produce en las mitocondrias [14], mientras que en levaduras, la vía de la β -oxidación tiene lugar sólo en los peroxisomas. La β -oxidación peroxisomal se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, mucho más que la β -oxidación mitocondrial, que

está restringida sólo al reino animal.

Los genes de un gran número de proteínas peroxisomales, incluyendo enzimas involucradas en la β -oxidación, han sido clonados y caracterizados. Además se han detectado en los peroxisomas enzimas auxiliares requeridas para la degradación de ácidos grasos insaturados e hidroxiácidos grasos. Todas las proteínas peroxisomales conocidas hasta ahora son sintetizadas en ribosomas libres y luego son importadas a los peroxisomas. Existen dos tipos de señales de direccionamiento a peroxisomas, PTS1 y PTS2 (Protein Targeting Signal 1 o 2). La secuencia de la señal PTS1 es el tripéptido Ser-Lys-Leu (SKL) y se encuentra en el extremo C-terminal de las proteínas. La señal PST2 puede encontrarse en el extremo N-terminal o ser interna y presenta la secuencia consenso bipartita (R/K) (L/V/I)X5(H/Q)(L/A) [15]. Las proteínas Pex5p y Pex7p interaccionan con las secuencias PST1 y PST2 respectivamente. Luego, estas proteínas interactúan con un complejo ubicado en la membrana de los peroxisomas que se encarga de la importación [16]. Este sistema permite la maduración de los peroxisomas y la incorporación de enzimas implicadas en el metabolismo de lípidos.

La conversión a ésteres de CoA es el primer paso obligatorio para la β -oxidación porque los verdaderos sustratos de la oxidación son los acil-CoAs y no los ácidos grasos libres. Tanto los ácidos grasos endógenos como los exógenos son activados por unión de Coenzima A (CoA). Esto es llevado a cabo por una variedad de acil-CoA sintetasas que difieren por su especificidad hacia diferentes sustratos y localización subcelular.

Después de ser transportados a través de la membrana peroxisomal los acil-CoAs son sustratos de la β -oxidación, la cual está catalizada por tres enzimas, la acil-CoA oxidasa, la proteína multifuncional hidratasa-deshidrogenasa y la tiolasa.

El sistema de β -oxidación peroxisomal no es sólo un duplicado del sistema mitocondrial, sino que los peroxisomas están involucrados en la degradación de un grupo de compuestos distinto [14]. Por ejemplo, los ácidos grasos saturados de cadena larga son oxidados predominantemente en mitocondrias. En cambio las etapas iniciales de oxidación de los ácidos grasos de cadena muy larga (a partir de 24 carbonos) se producen en peroxisomas. Otros metabolitos de la β -oxidación en los peroxisomas son los ácidos grasos con poli- insaturaciones, ácidos grasos ramificados, ácidos dicarboxílicos y prostaglandinas. Además, en los peroxisomas también se encuentra la maquinaria del metabolismo de glioxilato, colesterol, dolicol y la síntesis de éteres lipídicos.

2. *Yarrowia lipolytica*: alta eficiencia en utilización de lípidos

Las células de levaduras son similares a las células de eucariotas superiores con

respecto a la compartimentación intracelular y a la organización subcelular de membranas. Este hecho, sumado a la relativa facilidad de su manipulación genética, convierte a las levaduras en modelos atractivos para estudios del metabolismo y transporte de lípidos.

Yarrowia lipolytica es una de las levaduras no convencionales más utilizada como modelo de estudio de secreción de proteínas, biogénesis de peroxisomas, dimorfismo, degradación de sustratos hidrofóbicos, etc [17]. La manipulación genética de esta levadura es relativamente sencilla, favoreciendo el estudio de las proteínas involucradas en estos procesos. Esto se demuestra en diversos trabajos donde fueron generadas cepas mutantes mediante eliminación de genes por recombinación genética [18]. Además, recientemente fue determinada la secuencia completa de los seis cromosomas de *Y. lipolytica* [19].

Esta levadura es conocida por su capacidad de crecer en medios de cultivo conteniendo ácidos grasos de cadena larga como única fuente de carbono y contiene un sistema de β -oxidación inducible por ácidos grasos y *n*-alcanos [17]. La activación del sistema oxidativo de ácidos grasos comienza muy rápidamente (de 2 a 5 minutos luego de la incubación). La presencia de ácidos grasos y otras señales intraperoxisomales inducen la proliferación de peroxisomas en *Y. lipolytica*. Esto es consistente con el hecho de que la oxidación de ácidos grasos en levaduras se produce exclusivamente en los peroxisomas y no en mitocondrias, como ocurre en las células de organismos eucariotas superiores. Por ejemplo, se han reportado estudios donde se utilizan células de *S. cerevisiae* en fase exponencial crecidas en medios conteniendo glucosa como inóculos en experimentos de transferencia a distintos medios de cultivo [20]. La transferencia de estas células a medios complementados con ácido oleico provoca la proliferación de peroxisomas, asociada con la inducción de actividades de β -oxidación. La proliferación es reprimida por glucosa, reactivada por fuentes de carbono no fermentables y completamente inducida por ácidos grasos [20].

El modelo del crecimiento y división de los peroxisomas en *Y. lipolytica* propone la existencia de seis sub-formas de los peroxisomas, llamadas P1-P6 [21]. La conversión de estas sub-formas en una manera ordenada de P1 a P6 resulta en la formación de peroxisomas maduros. Los intermediarios más tempranos P1 y P2 poseen la mayoría de las proteínas de matriz peroxisomal y algunas proteínas de matriz asociadas con los peroxisomas maduros. Estos intermediarios P1 y P2 se fusionan para formar P3, luego P3 se convierte en P6 mediante la incorporación de proteínas de matriz. La división de los peroxisomas está controlada por dos mecanismos involucrados en la separación de la membrana peroxisomal. Estos mecanismos responden a señales específicas transmitidas desde el interior del peroxisoma, a través de cascadas de señalización intra-peroxisomal

dependientes de Aox y Pex16p [21].

El número reducido de peroxisomas maduros resultado de este mecanismo de control no afecta el flujo metabólico de la β -oxidación. Este mecanismo de control coexiste con otro mecanismo denominado control metabólico de la abundancia de peroxisomas, el cual depende del flujo metabólico de la β -oxidación de ácidos grasos. En este control metabólico está involucrada la enzima multifuncional de tipo 2 (MFE2, por *multifunctional enzyme type 2*). El gen MFE2 de *Y. lipolytica* posee un elemento de respuesta a ácido oleico en su promotor por lo cual la expresión de esta enzima es inducida en presencia de este ácido graso. Se encontró que las células mutantes de esta levadura con una eliminación en el gen MFE2 (mfe2-KO) poseen peroxisomas más grandes y en mayor cantidad que las células normales. Estos resultados sugieren que la enzima MFE2 contribuye a la regulación del número y tamaño de los peroxisomas en *Y. lipolytica* [22]. Otros estudios realizados en *Y. lipolytica* demostraron que además del mecanismo de inducción de peroxisomas existe un mecanismo de degradación de los mismos, el cual es inducido por un cambio en las condiciones de crecimiento [23].

Es de gran importancia determinar cuáles son los mecanismos que hacen a *Y. lipolytica* una levadura tan eficiente para el consumo de lípidos. Para ello es vital discriminar que proteínas están involucradas en el transporte y metabolismo de estos ligandos. Las enzimas necesarias para la utilización de estos sustratos son importadas a los peroxisomas mediante el sistema Pex, el cual reconoce las señales PTS1 y PTS2. Para estudiar proteínas esenciales en este proceso se realizaron estudios de complementación en células mutantes deficientes en la importación de proteínas a peroxisomas. De esta manera se encontró una proteína de membrana de *Y. lipolytica* llamada Pay2p que es esencial para la importación de proteínas a peroxisomas. La cepa mutante con una eliminación en el gen Pay2 no puede completar la importación a peroxisomas de proteínas con alguna de las señales PTS1 o PTS2, lo que sugiere que Pay2p estaría asociada con el sistema de importación de proteínas Pex [24].

El catabolismo de sustratos hidrofóbicos de *Y. lipolytica*, como *n*-alcanos, ácidos grasos y triacilglicéridos, es un metabolismo complejo que involucra varias rutas y diferentes compartimientos subcelulares (Figura 2). Una característica importante de la asimilación de *n*-alcanos por levaduras es el flujo metabólico de carbono desde el sustrato hacia la síntesis de todos los componentes celulares por medio de los ácidos grasos, que es diferente en el caso de sustratos como carbohidratos. La asimilación de *n*-alcanos en levaduras ocurre vía caminos de oxidación mono y di-terminal. Los principales pasos para la degradación de estos sustratos hidrofóbicos son: (a) obtención y transporte de los sustratos hidrofóbicos hacia el sitio donde ocurre la oxidación primaria; (b) oxidación

primaria o monoterminal de los alcanos, también puede ocurrir oxidación ω o diterminal, principalmente en ácidos dicarboxílicos; (c) activación de los ácidos grasos libres a su correspondiente éster CoA, los cuales son degradados a acetil-CoA y propionil-CoA vía oxidación β peroxisomal, dependiendo de las condiciones ambientales las células pueden acumular ácidos grasos libres en cuerpos lipídicos; y (d) síntesis de intermediarios del ciclo del ácido tricarboxílico [17].

2.1. Contacto entre las células y el sustrato

Los sustratos hidrofóbicos deben interaccionar con la superficie celular para poder ingresar a la célula. Se han formulado dos hipótesis para explicar el transporte de sustratos poco miscibles con agua hacia el interior de los microorganismos. La primera es el mecanismo mediado por surfactantes, el cual postula que estos compuestos pueden ser disueltos (o pseudo-disueltos) mediante compuestos activos surfactantes. El segundo es un mecanismo de transporte directo basado en la adhesión directa de estos compuestos a la pared celular. En *Y. lipolytica* se han encontrado evidencias de ambos mecanismos, esta levadura produce surfactantes [25][26], induce la adhesión celular y aumenta las propiedades apolares de su superficie celular durante el crecimiento en sustratos hidrofóbicos [27]. Esta modificación de la hidrofobicidad de la superficie celular parece estar relacionada con la presencia de prolongaciones de la superficie de las células similares a canales que conectan la pared celular con el interior de la célula [27].

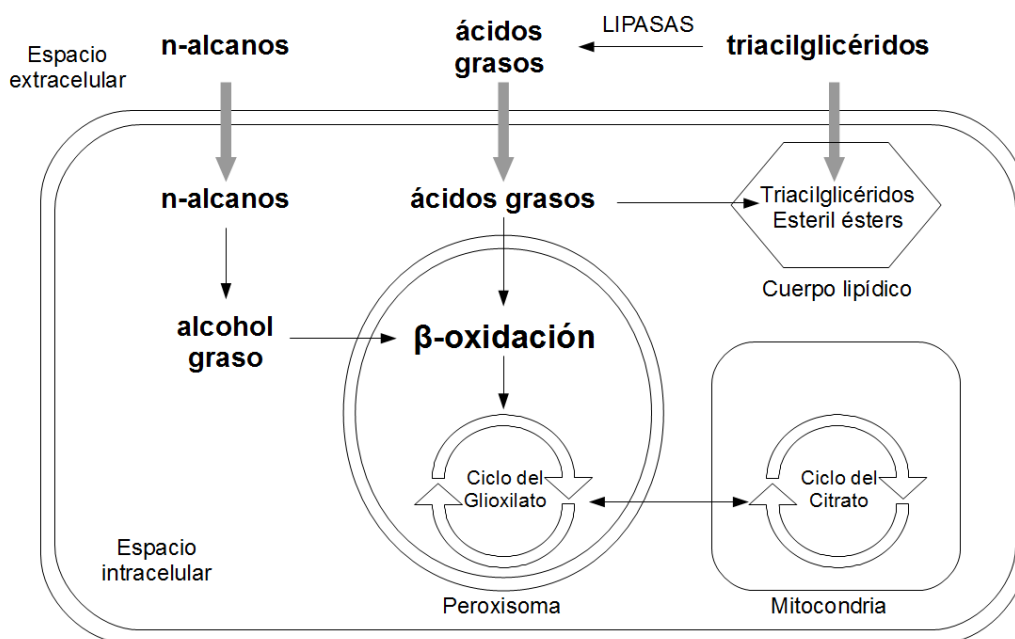


Figura 2. Esquema del catabolismo de n-alcanos, ácidos grasos y triacilglicéridos en *Y.*

lipolytica.

2.II. Obtención y transporte de los sustratos hidrofóbicos

Y. lipolytica comienza la asimilación de lípidos complejos (como triglicéridos) con una hidrólisis extracelular catalizada por enzimas lipolíticas, produciendo ácidos grasos libres y glicerol. Esta levadura produce lipasas extracelulares, unidas a membranas e intracelulares [28][29]. Entre estas lipasas se encuentran LIP1-LIP8 [30], cuatro genes que codifican para carboxilesterasas/lipasas del tipo B y dieciséis genes que codifican para triacilglicerol lipasas.

Los ácidos grasos y los *n*-alcanos pueden ingresar en las células de *Y. lipolytica* mediante difusión espontánea. Los ácidos grasos adsorbidos en la membrana de esta levadura difunden libremente si se encuentran a una concentración mayor a 10 μ M, de lo contrario requieren un transportador transmembrana [31]. Las células de *Y. lipolytica* creciendo en presencia de compuestos hidrofóbicos presentan prolongaciones de la superficie celular, disminución del ancho de la pared celular y del espacio periplásmico, invaginaciones de la membrana y canales con estructuras asociadas al retículo endoplasmático que conectan el exterior de las prolongaciones de la pared celular con el interior de la célula [27].

Una vez dentro del citoplasma los lípidos deben mantenerse solubles y ser dirigidos a peroxisomas. Las levaduras contienen proteínas transportadoras de lípidos que participan en la biogénesis y mantenimiento de membranas, análogamente a lo que ocurre en eucariotas superiores. En *Y. lipolytica* fue detectada una proteína inducible por palmitato que une lípidos identificada como una proteína transportadora de esteroides (YLSCP2) [10][32][33]. Además *Y. lipolytica* tiene proteínas de transporte de fosfolípidos (PLTPs) como las descritas previamente en otras levaduras y en eucariotas superiores. La proteína transportadora de fosfatidil inositol y fosfatidil colina no es requerida para mantener la viabilidad de *Y. lipolytica* y tampoco participa en la vía secretoria de este organismo según una determinación de función realizada en otras levaduras [34].

2.III. Oxidación primaria de *n*-alcanos

La β -oxidación se produce en levaduras en forma similar a mamíferos [35]. Sin embargo se presentan algunas diferencias a nivel funcional entre las distintas especies de levaduras. El primer paso de la oxidación primaria o monoterminal de *n*-alcanos y de la oxidación ω o diterminal de ácidos grasos involucra una hidroxilación terminal mediante el sistema mono- oxigenasa P450 o ω -hidroxilasa, respectivamente. Esto resulta en la producción de alcoholes grasos a partir de *n*-alcanos o ácidos grasos ω -hidroxilados. El

segundo paso es realizado por deshidrogenasas dependientes de NAD⁺-NADP⁺ (unidas a membrana o solubles) o por oxidasas productoras de peróxido de hidrógeno, las cuales convierten los grupos hidroxilos terminales en su correspondiente aldehído graso. El tercer paso involucra la oxidación del aldehído graso a un ácido graso libre, catalizada por una deshidrogenasa dependiente de NAD(P)⁺ del retículo endoplasmático o peroxisomal. Estos pasos de oxidación resultan finalmente en una producción de ácidos grasos a partir de *n*-alcanos o en una producción de ácido dicarboxílico a partir de ácidos grasos.

Durante el crecimiento de *Y. lipolytica* en *n*-alcanos y ácidos grasos se inducen ω -hidrolasas de ácidos grasos y sistemas monooxigenasa P450 [36]. Se identificaron ocho isoformas de P450 inducibles por alcanos o ácidos grasos, las cuales pertenecen a la familia de genes CYP 52 (ALK1-ALK8), y un gen CPR en la cepa CX161-1B. Recientemente se han expresado ocho genes ALK en hojas de la planta *Nicotiana benthamiana* de la cepa ATTC-8661, determinando que los genes ALK3, ALK5 y ALK7 codifican para ω hidrolasas de ácido laúrico, mientras que no se detectó actividad ω -hidrolasa con los genes ALK1, ALK2, ALK4 y ALK6 [37].

Está establecido en levaduras que utilizan *n*-alcanos que la oxidación de los *n*-alcanos de cadena larga hasta aldehídos grasos es catalizada mayormente por una oxidasa unida a la membrana peroxisomal. Aunque se detectó actividad ácido graso oxigenasa en *Y. lipolytica* no se han encontrado sus genes utilizando secuencias de diferentes especies de *Candida sp.*

En varias levaduras que asimilan *n*-alcanos, incluyendo a *Y. lipolytica* se detectó actividad deshidrogenasa de ácidos grasos dependientes de NAD(P)⁺. Cuando se utilizó la secuencia aminoacídica de la FALDH humana se encontraron cuatro genes FALDH putativos llamados FALDH1-4, siendo FALDH 4 inducible por alcanos.

2.IV. Degradación de ácidos grasos por β -oxidación

Los ácidos grasos son convertidos a ésteres de acil-CoA cuando ingresan a la célula. En *Y. lipolytica* se han detectado dos sintetasas específicas de largas cadenas de acil-CoA (ACS I y ACS II) [38][39]. La enzima ACS I está distribuida entre varias fracciones celulares y parece estar involucrada en la síntesis de lípidos, mientras que ACS II está presente en peroxisomas donde ocurre la β -oxidación, el principal camino para la ruptura de los acil-CoA. Este sistema de degradación consiste en una secuencia de cuatro reacciones que resulta en un acortamiento del acil-CoA. Este ciclo se repite varias veces, teóricamente hasta la ruptura completa del acil-CoA. *Y. lipolytica* posee varios genes que codifican para acil-CoA oxidasas, lo que indica una adaptación de esta levadura a los sustratos hidrofóbicos. En total esta levadura posee seis genes POX que codifican Aox1-

Aox6. Recientemente se clonó una acetoacetyl-CoA tiolasa inducible por decano mediante complementación de una mutante. Esta enzima tiene una alta homología con las enzimas correspondientes en *C. Tropicalis* y *S. Cerevisiae* [40]. Una segunda acetoacetyl tiolasa se encontró en la secuencia del genoma de *Y. lipolytica*. Se cree que estas tiolasas están involucradas en el último paso de la β -oxidación.

El acetyl-CoA formado en la β -oxidación entra en el ciclo del glioxilato y es unido al ácido tricarbónico y ciclos metilcitrato. El gen ICL2 que codifica para la enzima clave metilisocitrato liasa se encuentra en la secuencia genómica de *Y. lipolytica*.

2. V. Acumulación de lípidos

Dependiendo de las condiciones ambientales las levaduras son capaces de movilizar ácidos grasos libres o de almacenarlos como triacilglicerol y esteril esters dentro de cuerpos lipídicos. Estos cuerpos lipídicos consisten en un núcleo hidrofóbico formado por lípidos neutros y rodeado por una monocapa fosfolipídica con algunas proteínas incorporadas [41].

Durante el crecimiento de *Y. lipolytica* con ácidos grasos o triglicéridos se observa una acumulación de cuerpos lipídicos [42]. El contenido y la composición de estos cuerpos lipídicos depende de las condiciones de crecimiento y de la composición del sustrato.

3. Objetivos de la tesis

Los lípidos cumplen roles importantes en diversas funciones biológicas a pesar de presentar una muy baja solubilidad en agua, el solvente principal de la vida. Los mecanismos celulares desarrollados para el manejo de los lípidos permiten la utilización de los mismos y mantienen la correcta homeostasis celular. En mamíferos, cualquier alteración en alguno de estos mecanismos puede producir patologías como diabetes [43], aterosclerosis [43], lipotoxicidad [44], enfermedad de Niemann-Pick [45] y mal de Alzheimer [46], entre otras. Estudiar cómo las células manejan los lípidos es un paso importante en la comprensión de toda la fisiología y bioquímica celular.

El transporte intracelular mediado por las SLBP parece ser un mecanismo importante para la disolución y movilización intracelular de lípidos. Sin embargo, actualmente no está claro si las SLBP son indispensables para el correcto funcionamiento celular. Las distintas SLBP difieren en su estructura, filogenia, localización tisular e intracelular y espectro de unión de ligandos, presentando un panorama complejo para la interpretación de las funciones de estas proteínas. Sin embargo, entre las SLBP podemos encontrar una familia con propiedades que abarcan las de todos los integrantes: las proteínas transportadoras de esterol (SCP2).

Las SCP2 unen un amplio grupo de lípidos incluyendo los ligandos de todas las SLBP y son las únicas presentes en todos los reinos biológicos. Esta familia de proteínas ha sido estudiada mayormente en mamíferos, organismos donde se expresan otras SLBP y otras enzimas multidominios que poseen uno o más dominios SCP2 [47]. Estos sistemas de estudio evidentemente no son los mejores para determinar la relevancia biológica de las SCP2.

Un sistema alternativo para el estudio del metabolismo de lípidos es la levadura *Yarrowia lipolytica*, la cual posee una alta capacidad de consumo de compuestos hidrofóbicos [17]. Nuestro laboratorio identificó y aisló la proteína transportadora de esteroides de *Yarrowia lipolytica* (YLSCP2), la cual es la única SLBP presente en el microorganismo. Estas características hacen de *Yarrowia lipolytica* y YLSCP2 un excelente modelo para el estudio de la familia de proteínas transportadoras de esteroides. La caracterización de YLSCP2 puede develar la función de esta familia de proteínas en el metabolismo de lípidos.

El objetivo general de este trabajo de tesis es completar una caracterización estructural, termodinámica y funcional de YLSCP2, buscando esclarecer el mecanismo funcional de las SCP2. Los objetivos específicos son la caracterización biofísica, la determinación de la unión de diversos ligandos hidrofóbicos y el estudio del efecto de la unión de dichos ligandos sobre la estructura y la estabilidad de la proteína.

Capítulo II

CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE YLSCP2



1. Introducción

1.1. La familia de genes *SCP2*

La familia de genes de las proteínas transportadoras de esteroides-2 (*SCP2*) está formada por dominios *SCP2* únicos y/o fusionados a otros dominios enzimáticos (tiolasa, hidratasa y/o deshidrogenasa). Estas enzimas multidominio están implicadas en el metabolismo de lípidos y en algunas de ellas el dominio *SCP2* se libera por degradación proteolítica. La distribución filogenética de los genes *SCP2* es muy diversa y se pueden encontrar representantes en todos los reinos biológicos (Tabla I).

En el genoma humano hay cinco genes que contienen el dominio *SCP2* (Tabla I), cuatro de ellos están formando parte de enzimas multidominio y uno consta del dominio *SCP2* sin fusionar [13]:

- ◆ El gen *HSD17B4* expresa una proteína bifuncional-D (DBP, *D- bifunctional protein*) de 80 kDa, la 17 beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo IV, conocida también como MFE2 (*multifunctional enzyme type 2*) [48]. Esta proteína está compuesta por los dominios D-3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, enoil-CoA hidratasa y *SCP2* [49].
- ◆ El gen *SCPX* está compuesto por 16 exones y 15 intrones y codifica para una tiolasa fusionada a *SCP2* [50]. Existen dos promotores de transcripción para el gen *SCPX*, a partir de los que se originan los ARN mensajeros (mARN) de la tiolasa *SCPX* (58-kDa) y de pre *SCP2* (15-kDa) [51]. Las proteínas producidas por ambos mARN dan como resultado el dominio *SCP2* de 13-kDa sin fusionar (Figura 1).
- ◆ El gen *HSDL2* codifica la enzima hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo-2 (*HSDL2*, *hydroxysteroid dehydrogenase- like 2*), una proteína de 45 kDa que posee un dominio N-terminal con actividad deshidrogenasa de cadena corta seguido por un dominio *SCP2* [52].
- ◆ El gen *STOML1* codifica la proteína de 43 kDa estomatina tipo 1 (*STOML1*, *stomatatin-like 1*), compuesta por un dominio estomatina tipo-1 (proteína integral de membrana [53]) seguido por un dominio *SCP2* [54].
- ◆ El gen *C20orf79* posee la secuencia para codificar una *SCP2* de dominio único, de 156 aminoácidos [55]. Sin embargo, todavía no se han publicado datos sobre la caracterización de esta proteína putativa.

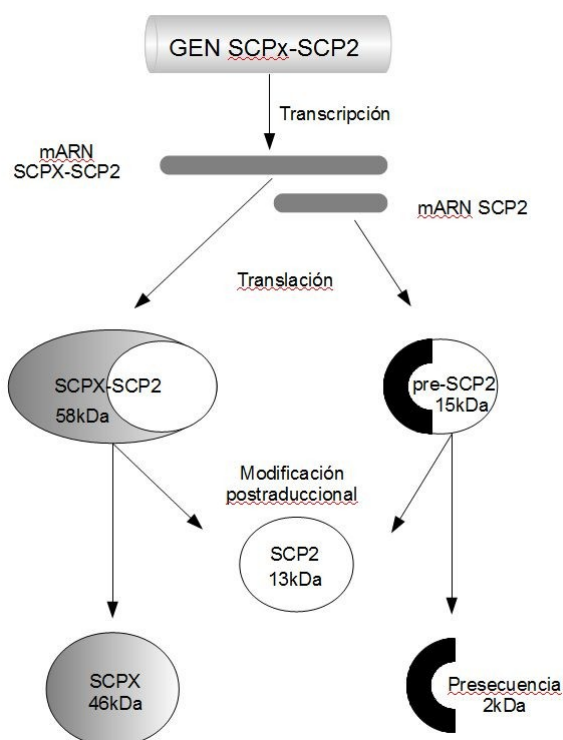


Figura 1. Esquema de los productos proteicos obtenidos a partir del gen *SCPX* de humanos. Los ARN mensajeros codifican para SCPX-SCP2 y pre-SCP2, a partir de ambas proteínas se obtiene SCP2 madura luego de una proteólisis.

Se han identificado proteínas SCP2 similares a las reportadas en humanos en otros metazoos (Tabla I). Por ejemplo, el gen *SCPX* ha sido reportado en ratones [56], ratas [57], gallos [58] e insectos [59]. Sin embargo, los homólogos del gen *C20orf79* sólo se encuentran en mamíferos [13].

En el nematodo *Caenorhabditis elegans* el dominio SCP2 se encuentra en cuatro loci de los cuales sólo uno de ellos codifica una proteína con dominio SCP2 sin fusionar (Tabla I) [60][61].

En insectos, especialmente en *Diptera*, se encuentran múltiples copias del gen SCP2. En *Drosophila melanogaster* se conocen tres genes que codifican para dominios SCP2 [62][59] y en el mosquito de la malaria *Anopheles gambiae* hay al menos seis genes que codifican para SCP2 (Tabla I). En el mosquito de la fiebre amarilla *Aedes aegypti* se han detectado varios genes con dominios SCP2 a partir de los cuales se expresan AeSCPX [59], AeSCP2 [63], AeSCP2-L1 y AeSCP2-L2 [64] y recientemente fue identificado AeSCP2-L3 [65].

Tabla I. Miembros de la familia SCP2.

Ejemplos de genes y proteínas que contienen el dominio SCP2 en humanos (*H. sapiens*), nematodos (*C. elegans*), artrópodos (*A. gambiae*), hongos (*C. tropicalis* y *G. mosseae*), protistas (*T. gondii*, *D. discoideum*), plantas (*A. thaliana*) y arqueobacterias (*T. thermophilus*). Esquema de dominios: D-3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (pentágono blanco), enoil-CoA hidratasa (rombo gris), SCP2 (círculo negro), tiolasa (cuadrado gris), deshidrogenasa de cadena corta (triángulo blanco), estomatina (círculo doble) [13].

Organismo	Gen	Proteína	
<i>H. sapiens</i>	<i>HSD17B4</i>	MFE-1 (DBP)	
	<i>SCPX</i>	SCPX-SCP2	
	<i>HSDL2</i>	HSDL2	
	<i>STOML1</i>	STOML1	
	<i>C20orf79</i>	SCP2	
<i>C. elegans</i>	<i>dhs-28</i>	DBP	
	<i>dhs-6</i>	HSDL2	
	<i>unc-24</i>	UNC-24	
	<i>nlt-1</i>	SCP2	
<i>A. gambiae</i>	ENSANGG00000011810	ENSANGP00000014299	
	ENSANGG00000007479	ENSANGP00000009968	
	ENSANGG00000013825	ENSANGP00000016314	
	ENSANGG00000018004	ENSANGP00000020493	
	ENSANGG00000022459	ENSANGP00000026507	
	ENSANGG00000017981	ENSANGP00000020470	
<i>C. tropicalis</i>	<i>POX18</i>	PXP18	
<i>G. mosseae</i>	<i>BEG12</i>	GmFOX2	
<i>T. gondii</i>	<i>TgHAD-2SCP-2</i>	TgHAD-2SCP-2	
<i>D. discoideum</i>	<i>mfeA</i>	MFE1 (DBP)	
	Gen ID: 3390058	DDBDRAFT_0186139	
<i>A. thaliana</i>	<i>AtSCP-2</i>	AtSCP-2	
<i>T. thermophilus</i>	Gen ID: 3168635	TTHA0401	

En varios hongos *ascomycetes* y *basidiomycetes* las SCP2 se expresan como proteínas de dominio único. En *Candida tropicalis* el gen *POX18* [66] codifica para la proteína PXP18 [67], una SCP2 que se localiza en peroxisomas [68]. En *Candida maltosa* se identificó el gen *POX18cm* que codifica para POXP18cm, proteína homóloga a PXP18 [69]. En el genoma de *Yarrowia lipolytica* CLIB122 [19] se encuentra el gen YALI0E01298g que codifica para SCP2. Las SCP2 de hongos no son sólo de dominio único, en el hongo *Glomus mosseae* (*Glomeromycota*) fue detectada una proteína que presenta el dominio SCP2 fusionado a DBP [70]. Las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*, organismos ampliamente utilizados en investigación, no

poseen genes con similitud a SCP2.

Los protistas *Paramecium auralia*, *Tetrahymena thermophila*, *Perkinsus marinus*, *Eimeria tenella* y *Sterkiela histrimuscorum* poseen dominios SCP2 sin fusionar y/o fusionados a DBP [13]. Recientemente fue caracterizada la enzima DBP TgHAD-2SCP-2 de *Toxoplasma gondii*, la cual posee un dominio SCP2 [71]. El mohó *D. discoideum* y el oomicete *Phytophthora sojae* poseen el dominio SCP2 en una enzima DBP [72] y en una proteína de fusión con dos dominios SCP2 consecutivos [13]. En otros protistas (*Cryptosporidium*, *Plasmodium*, *Trypanosoma* y *Leishmania*) no se han identificado dominios SCP2.

En plantas el dominio SCP2 se expresa solamente como una proteína de copia única sin fusionar (*A. thaliana*, *Oryza sativa*, *Cryptomeria japonica*, *Ceratopteris richardii*, *Physcomitrella patens* y *Chlamydomonas reinhardtii*) [13]. Esto es sorprendente, ya que en animales y muchos otros eucariotas el dominio SCP2 se encuentra formando parte de enzimas multidominio. Por otro lado, en plantas también se expresan proteínas transportadoras de lípidos no específicas (zanahoria [73] y trigo [74]), las cuales presentan diferencias estructurales con las proteínas SCP2 [75].

En eucariotas, el análisis evolutivo de los miembros SCP2 lleva a la hipótesis que el dominio SCP2 ancestral se encontraba formando parte de una enzima DBP, ya que esta fusión puede encontrarse en protistas, metazoos y micetozoos [13]. Además, los dominios SCP2 de enzimas DBP forman un grupo en un árbol filogenético, indicando que evolucionaron a partir de un ancestro común [13]. Es probable que los genes SCP2 de dominio único hayan surgido a partir de la fisión de los dominios tiolasa, deshidratasa y/o deshidrogenasa en los organismos eucariotas que complementan esas funciones en organelas.

En procariotas sólo se conocen dominios SCP2 sin fusionar de bacterias [76][77] y de arqueobacterias [78][79][80][81].

1.II. Características estructurales de SCP2

1.II.a. El motivo estructural SCP2

Las proteínas SCP2 poseen un motivo estructural $\alpha + \beta$, formado por una hoja- β de 5 hebras y 5 hélices- α (Figura 2) [82]. La estructura de las SCP2 de diversas especies está altamente conservada, demostrando que las características básicas del plegado SCP2 están preservadas entre los tres reinos biológicos (Figura 3). Hasta el momento se han reportado 8 estructuras cristalinas y 2 estructuras en solución para distintos miembros de las SCP2.

1.II.b. Estructuras reportadas de SCP2

La primera estructura de SCP2 resuelta fue el dominio SCP2 de la proteína de fusión SCPX de humanos (hSCP2, 1QND) [83]. La estructura en solución de hSCP2, obtenida por resonancia magnética nuclear (RMN), presenta 5 hebras- β y 4 hélices- α (Figura 3). La estructura del complejo entre hSCP2 y el receptor peroxisomal peroxina-5 de humanos (Pex5p) fue determinada mediante cristalografía de rayos-X con una resolución de 2.3 Å (2C0L) [84]. La estructura hSCP2 presenta en este caso 5 hélices- α en lugar de las 4 determinadas por RMN y la secuencia PTS1 ubicada en el extremo C-terminal se encuentra interaccionando con Pex5p (Figura 3). Esta estructura sugiere que la interacción entre hSCP2 y Pex5p no requiere que este unido un ligando a SCP2, pero si que el extremo C-terminal de SCP2 se encuentre expuesto. Esto es así en hSCP2 y pre-hSCP2 (que contiene una pre-secuencia en el extremo N-terminal), donde los extremos N y C-terminal se encuentran desorganizados y altamente flexibles [85].

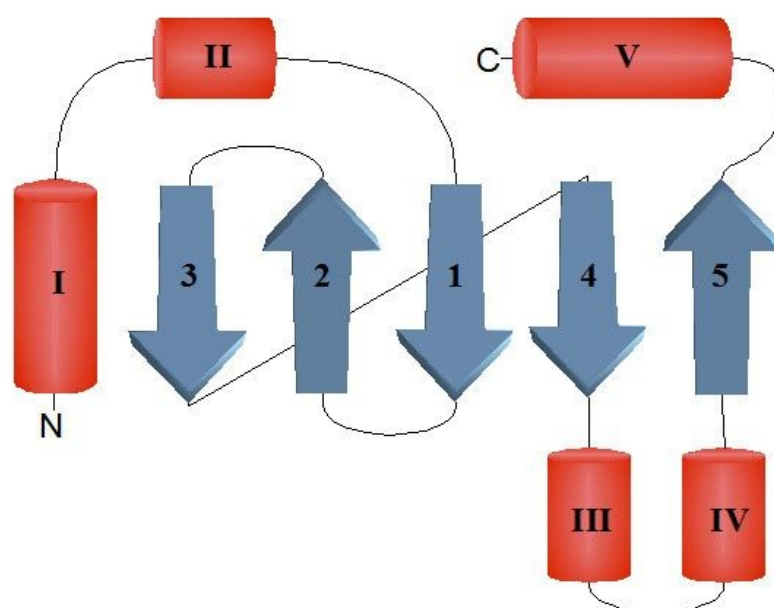


Figura 2. Esquema general del motivo estructural de las proteínas transportadoras de esteroides (SCP2). Se representa el orden de las hélices- α (cilindros rojos) con números romanos y de las hebras- β (flechas azules) con números cardinales y se indican los extremos N terminal (N) y C-terminal (C).

La estructura de SCP2 de conejo (cSCP2) fue determinada mediante cristalografía de rayos-X con una resolución de 1.8 Å (1C44) [86]. El plegado de cSCP2 presenta motivo $\alpha + \beta$ formado por 5 hebras- β y 5 hélices- α , los cuales forman una cavidad hidrofóbica que

podría ser el sitio de unión de ligandos (Figura 3). La estructura determinada en solución para pre-cSCP2 (cSCP2 con la pre-secuencia en el extremo N-terminal) presenta los mismoselementos de estructura secundaria que hSCP2 en solución [87][88].

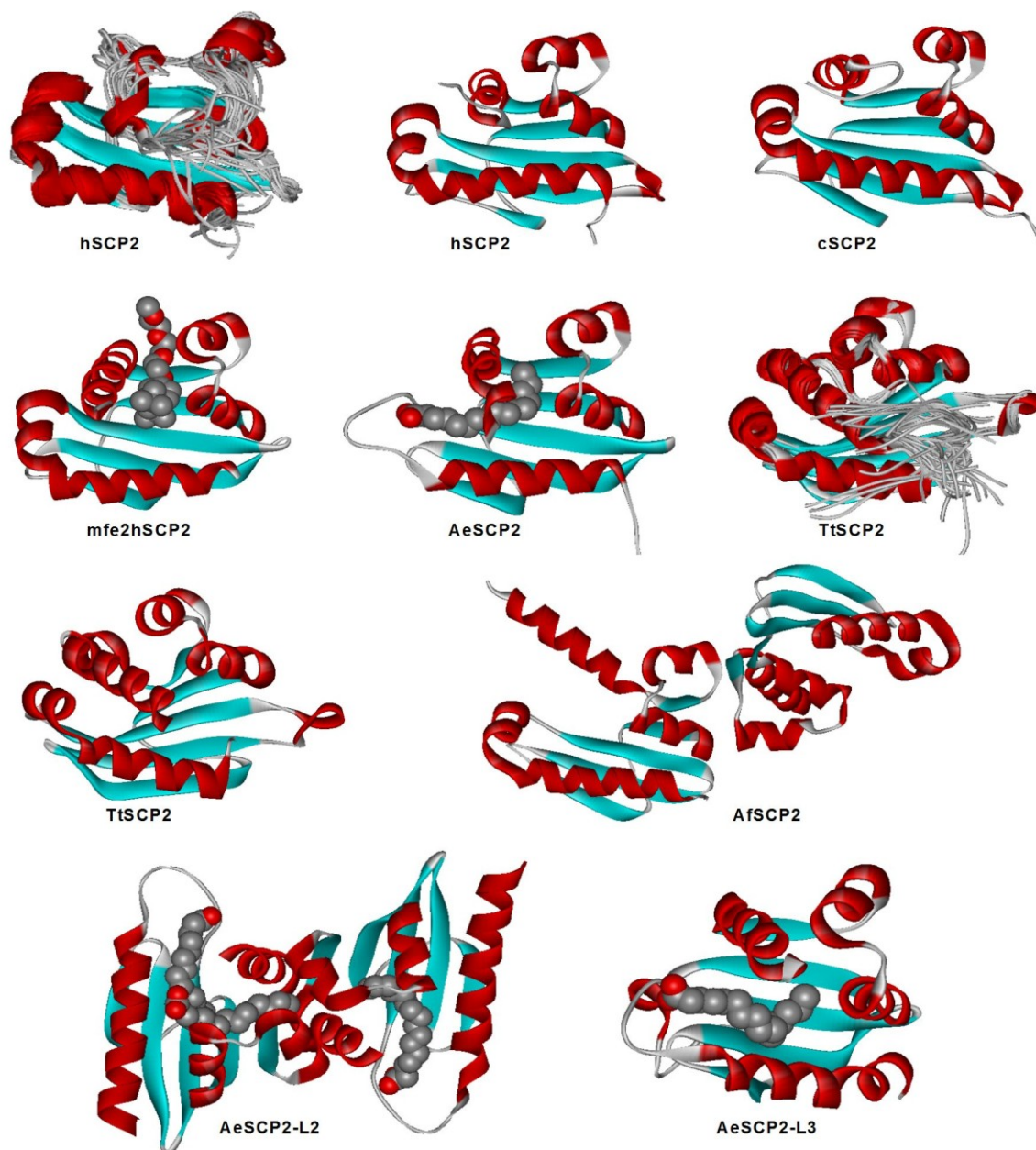


Figura 3. Estructuras tridimensionales resueltas para las SCP2 de humano (hSCP2: 1QND, 2C0L, y mfe2hSCP2: 1IKT), conejo (cSCP2: 1C44), mosquito (AeSCP2: 1PZ4, AeSCP2-L2: 3BDQ, y AeSCP2-L3:3BKR) y arqueobacterias (TtSCP2: 1WFR, 2CX7, y AfSCP2: 3BN8). Las hélices- α se representan en rojo y las hebras- β en celeste, los ligandos unidos se muestran como esferas (gris:carbono, rojo:oxígeno).

La primera estructura de un complejo de SCP2 con un ligando fue obtenida mediante cristalografía de rayos-X (1.75 Å de resolución) del dominio SCP2 de la enzima multifuncional MFE2 de humanos (mfe2hSCP2) con Tritón X-100 (1IKT) [89]. La estructura de mfe2SCP2 está compuesta por 5 hebras- β y 5 hélices- α , formando una cavidad hidrofóbica que corta transversalmente a la proteína (Figura 3). Esta cavidad conforma el sitio de unión de ligandos y se encuentra ocupada por una molécula del detergente Tritón X-100. Además, se puede observar una entrada adicional a la cavidad que sugiere un sitio de unión con forma de “L”.

La siguiente estructura de SCP2 en complejo con un ligando fue determinada mediante cristalografía de rayos-X (resolución de 1.35 Å) del complejo entre SCP2 del mosquito de la fiebre amarilla *Aedes aegypti* (AeSCP2) y una molécula de ácido palmítico (1PZ4) [90]. El plegado de AeSCP2 es muy similar al de hSCP2 y cSCP2, consistiendo en una hoja- β de 5 hebras cubierta por cuatro hélices- α (Figura 3). Sin embargo, los residuos que forman la hélice- α II en otras SCP2 (hSCP2, cSCP2 y mfe2SCP2) están formando un *loop* en AeSCP2. El grupo carboxilato del ácido graso se encuentra coordinado por el segmento de aminoácidos donde debería estar la hélice- α II, mientras que la cadena hidrocarbonada se encuentra enterrada en el interior de la proteína. La orientación del ácido graso es diferente a la reportada para el Tritón X-100 unido a mfe2SCP2 [89]. Este resultado fue el primero en mostrar la flexibilidad conformacional del sitio de unión de la familia de proteínas SCP2.

Las SCP2 de las arqueobacterias *Thermus thermophilus* HB8 (TtSCP2) y *Archaeoglobus fulgidus* (AfSCP2), presentan las mismas características estructurales reportadas para otras SCP2 (Figura 3). La estructura de TtSCP2 fue determinada mediante RMN (1WFR) [91] y cristalografía de rayos-X con 1.75 Å de resolución (2CX7) [92], mientras que la de AfSCP2 fue determinada mediante cristalografía de rayos-X con 2.11 Å de resolución (3BN8) [93]. Las estructuras cristalográficas TtSCP2 y AfSCP2 presentan dos moléculas de proteína en la misma celda cristalográfica. Esto sugiere que la estructura de estas SCP2 podría ser un dímero, pero no se han reportado evidencias biológicas que confirmen la existencia de la especie dimérica.

Recientemente fue determinada mediante cristalografía de rayos-X (resolución de 1.7 Å) la estructura de la proteína tipo SCP2 de *A. aegypti* (AeSCP2-L2) en complejo con tres moléculas de palmitato (2QZT y 3BDQ) [94]. AeSCP2-L2 exhibe un plegado $\alpha + \beta$ con una hoja- β de 5 hebras anti-paralelas y cuatro hélices- α (Figura 3). En la celda cristalográfica de AeSCP2 L2 se observa una estructura dimérica formada por la interacción del extremo C- terminal. En este homodímero de AeSCP2-L2 las

tres moléculas de palmitato se ubican de forma diferente, sugiriendo que el sitio de unión cercano al extremo C-terminal se forma por la dimerización de la proteína. Este es el primer reporte de la estructura de un miembro SCP2 dimérico en complejo con ligandos, indicando que la familia SCP2 tiene un modo de interacción con ligandos muy diverso. Esta estructura dimérica no es un fenómeno artificial inducido por el proceso de cristalización ya que la misma fue detectada *in-vivo* en el mosquito [65]. El homodímero formado tiene una superficie de contacto de $663 \text{ \AA}^2$, equivalente al 10% de la superficie total de SCP-2L2.

Poco después fue identificado un nuevo miembro SCP2-L de *A. aegypti* (AeSCP2-L3). La estructura de AeSCP2-L3 con palmitato unido fue determinada mediante cristalografía de rayos-X, con $1.4 \text{ \AA}$ (3BKR) y $2.1 \text{ \AA}$ (3BKS) de resolución [65]. Esta proteína presenta la conformación estructura característica de las SCP2 y la posición del ácido graso es similar a la reportada la AeSCP2 (Figura 3).

Estos resultados obtenidos por cristalografía de rayos-X o RMN pueden de suma importancia para comprender el mecanismo de función de las SCP2. Sin embargo, estas técnicas pueden presentar algunas complicaciones. Por ejemplo, para realizar este tipo de ensayos se necesita una concentración de proteína muy alta ($>10 \text{ mg/mL}$), mucho mayor que las concentraciones *in-vivo*. Por otro lado, la similitud entre la estructura de una proteína en los cristales y en solución podría diferir, llevando a conclusiones erróneas. Es por esto que el uso de otras técnicas para estudiar la estructura de proteínas en solución y a menores concentraciones puede ser indispensable para un correcto análisis estructural.

1.II.c. Dicroísmo circular de las SCP2

El espectro de CD en el UV-lejano de las SCP2 es el típico para una proteína con estructura secundaria $\alpha + \beta$ [95]. El espectro de apo-hSCP2 a pH 7.4 presenta dos mínimos a 208 y 225 nm y un máximo a 193 nm. La composición de estructura secundaria estimada a partir del espectro indica que hSCP2 está compuesta por un 32 % de hélices- α , 21 % de hojas- β , 25 % de giros- β y 22 % de estructuras desordenadas [96][97]. Estos resultados concuerdan con el contenido de estructura secundaria observado en las estructuras cristalinas y en solución de las SCP2, sugiriendo que los espectros de CD pueden ser de gran utilidad para la caracterización de esta familia de proteínas.

1.II.d. Fluorescencia de triptofano de las SCP2

Existen varios trabajos donde se realizan ensayos de fluorescencia en miembros de la familia SCP2, los cuales presentan diferencias según la composición de aminoácidos aromáticos de cada proteína.

La SCP2 de hígado de rata (rSCP2) tiene 3 residuos de tirosina y presenta un espectro típico para la fluorescencia de tirosina con un máximo de excitación a una longitud de onda de 280 nm y un máximo de emisión a una longitud de onda de ~ 315 nm [98][99].

En la secuencia de hSCP2 hay un único residuo de triptofano que presenta una intensidad máxima de emisión de fluorescencia a una longitud de onda de ~ 330 nm luego de una excitación a una longitud de onda de 295 nm [100]. El triptofano se encuentra oculto al solvente según el valor de la longitud de onda del máximo de emisión de fluorescencia y la constante de atenuación por acrilamida ($K_{SV} = 4.19 \text{ M}^{-1}$). La forma de hSCP2 es elipsoidal a juzgar por la presencia de dos tiempos de correlación rotacional (32.2 y 2.8 ns) obtenidos por polarización de fluorescencia del triptofano [100]. Esto es confirmado por el valor del radio hidrodinámico obtenido por anisotropía de fluorescencia de triptofano (20.5 Å), el cual es un poco mayor que el esperado para una proteína de 13.2 kDa con forma esférica es (18.8 Å) [96].

Las propiedades espectroscópicas de hSCP2 fueron comparadas con las de su versión inmadura, pre-hSCP2, mediante absorbancia y fluorescencia [101]. La intensidad de absorbancia de pre-hSCP2 es mayor que la de hSCP2 y los espectros de emisión de fluorescencia muestran que hSCP2 tiene menor intensidad de emisión (y por ende de rendimiento cuántico). La longitud de onda del máximo de emisión es 330 nm para hSCP2 y 339 nm para pre-hSCP2. Los resultados anteriores junto con ensayos de atenuación de la emisión de fluorescencia con acrilamida indica que el triptofano de pre-hSCP2 se encuentra más accesible al solvente que el triptofano de hSCP2 [101]. Esto demuestra que el ambiente que rodea al triptofano en hSCP2 y pre-hSCP2 es diferente, presentando un mayor rendimiento cuántico y una mayor exposición al solvente en pre-hSCP2. Es probable que en hSCP2 el triptofano se encuentre formando una interacción nativa que produce una atenuación de su rendimiento cuántico y lo oculta del solvente.

La secuencia de SCP2 de hígado bovino (bSCP2) tiene un único triptofano y ninguna tirosina [102]. Luego de una excitación con una longitud de onda entre 280-300 nm se observa un espectro de emisión con un máximo entre 330-340 nm [103]. Las constantes de atenuación de la fluorescencia del triptofano con el agregado de iodo o acrilamida ($2.03 \pm 0.03 \text{ M}^{-1}$ y $5.24 \pm 0.05 \text{ M}^{-1}$) indican que el residuo de triptofano en bSCP2 se encuentra oculto al solvente. Además, el residuo de triptofano se encuentra inmóvil dentro de la

escala de tiempos de fluorescencia según el valor del tiempo de correlación rotacional (15 ns) obtenido por decaimiento de anisotropía de fluorescencia. Aunque este tiempo de correlación rotacional es grande para una proteína de 14 kDa, los ensayos de fluorescencia resuelta en el tiempo variando la temperatura (4-40 °C) y la concentración de proteína (0.17-10 μ M) indican que el volumen molecular se mantiene constante. El volumen de bSCP2 fue calculado asumiendo una forma elipsoidal, y el valor obtenido (17 000 cm³/mol) concuerda con una la presencia de 0.38 gramos de agua por gramo de una proteína (volumen teórico de 11700 cm³/mol), un grado de hidratación observado normalmente en proteínas de bajo peso molecular [104][103].

En general, el análisis de los resultados obtenidos por fluorescencia de las SCP2 aporta información estructural que concuerda con las estructuras tridimensionales resueltas para estas proteínas.

1.III. Objetivos para la caracterización estructural de YLSCP2

La familia de las SCP2 presenta una gran complejidad en la estructura y distribución filogenética de sus genes. A pesar de esto, la estructura proteica tridimensional de las SCP2 está altamente conservada en todos los reinos biológicos. Los ensayos de RMN, cristalografía de rayos-X, dicroísmo circular y fluorescencia de distintos miembros de SCP2 arrojan resultados similares sobre la conformación estructural de estas proteínas. Sin embargo, la mayoría de los trabajos reportados estudian las SCP2 de mamíferos, donde la interpretación de los ensayos bioquímicos y de los estudios *in-vivo* se complican por la presencia de otras proteínas pequeñas de unión de lípidos (FABP, ACBP, etc.) y de enzimas con múltiples dominios fusionadas a SCP2.

Estos hechos son la base de la postulación de YLSCP2 como un modelo general para el estudio de la familia de las SCP2. Para lograr esto es necesario caracterizar exhaustivamente las propiedades biofísicas y bioquímicas de YLSCP2. Este capítulo de la tesis está enfocado en la descripción e interpretación de los aspectos relevantes de la producción, purificación y caracterización estructural de YLSCP2, comparando los resultados con los reportados para otras SCP2.

2. Resultados

2.I. Producción de YLSCP2

2.I.a. Clonado

El gen que codifica para YLSCP2 fue amplificado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando como molde el ADN cromosomal de *Y. lipolytica* CX-121-

1B. Los fragmentos de ADN iniciadores de la PCR fueron diseñados a partir de la secuencia reportada para el genoma de *Yarrowia lipolytica* CLIB122 [19]. La secuencia óptima para cada fragmento de ADN fue obtenida luego de realizar un análisis informático de las secuencias (formación de estructuras de doble cadena y la temperatura de fusión) y una simulación del producto de la amplificación (Figura 4). La reacción de PCR con los oligonucleótidos que se unen fuera del marco de lectura (5'ylscp2 y 3'ylscp2-BamHI) fue realizada para secuenciar el gen completo (Figura 5). El resultado demuestra que la secuencia del gen de YLSCP2 de *Y. lipolytica* CX-121-1B es idéntica a la secuencia reportada para *Y. lipolytica* CLIB122 [19].

5'ylscp2			5'ylscp2-NdeI		
GTTTA GCTCCCCAGA ATATC			TCATTACAC AAAAACACAT ATGTCTCTC		
CTCCG	GTTTA GCTCCCCAGA ATATC	TCTT	TCATTACAC AAAAACACAT ATGTCTCTC		AGGTCGACGG
CTTCACTTCT	TCTATCATCT	TCGACGTCAT	CCGTGACGGT	CTTAACGACC	CCTCTCAGGC CAAGCAGAAG
GCTGAGTCCA	TCAAGAAGGC	CAACGCCATC	ATTGTCTTCA	ACCTCAAGAA	CAAGGCTGGC AAGACCGAGT
CTTGGTACCT	TGACCTCAAG	AACGACGGTG	ACGTCGGCAA	GGGCAACAAG	TCCCCAAGG GTGATGCTGA
CATCCAGCTC	ACTCTCTCTG	ACGACCACTT	CCAGCAGCTC	GTTGAGGGTA	AGGCTAACGC CCAGCGACTC
TTCATGACCG	GCAAGCTCAA	GGTTAAGGGC	AACGTCATGA	AGGCTGCCGC	CATTGAGGGT ATCCTCAAGA
ACGCTCAGAA	CAACCTC TAA	GCGCATCATT	TATTGATTAA	TT GATGATTT	ACTATATTGA TTTCGCAACT
			GTTGCGGA TCCAATATAG TAAATCATC		
			3'ylscp2-BamHI		

Figura 4. Secuencia del gen YLSCP2 de *Y. lipolytica* CLIB122 (390 pares de bases) y de los oligonucleótidos iniciadores de PCR (5'ylscp2, 3'ylscp2-BamHI y 5'ylscp2-NdeI). El inicio y final del marco de lectura se muestran en negrita, las zonas donde se unen los oligonucleótidos iniciadores en gris y los sitios de corte para enzimas de restricción están subrayados.

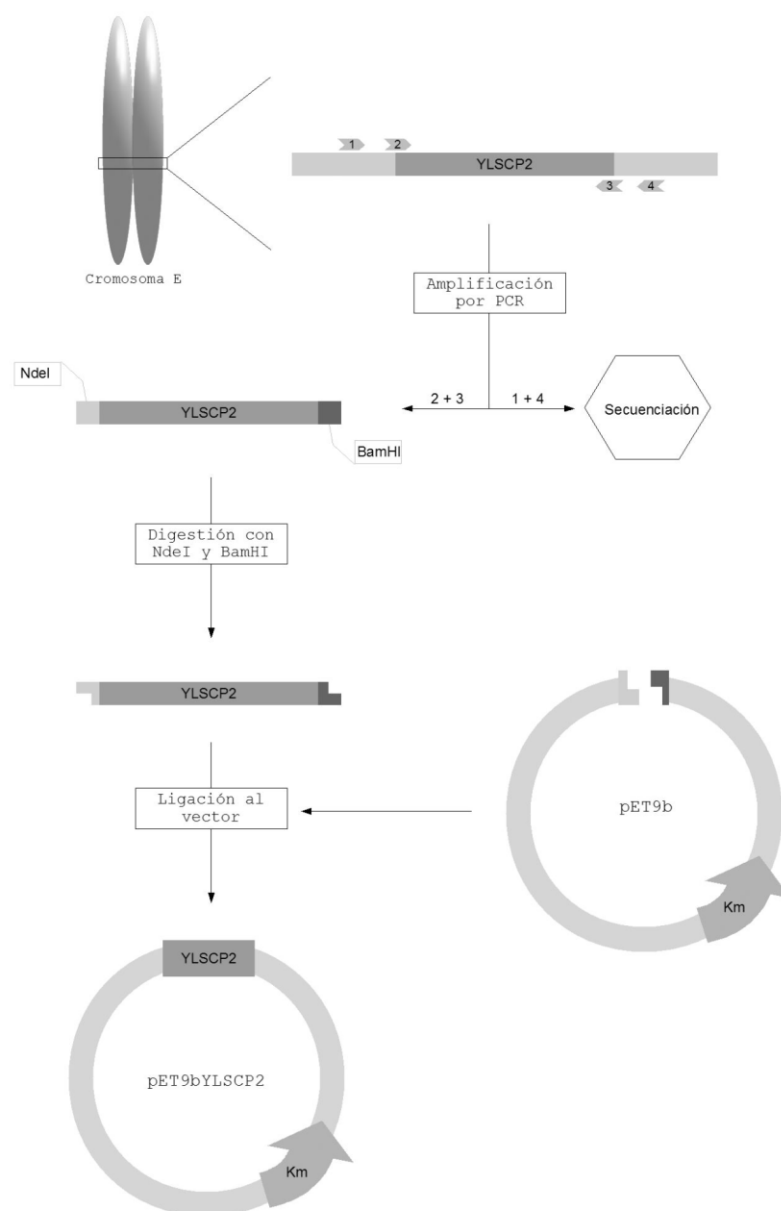


Figura 5. Esquema del clonado del gen YLSCP2. Los oligonucleótidos iniciadores de PCR utilizados para secuenciación fueron 5'ylscp2 (1) y 3'ylscp2-BamHI (3) y para clonado fueron 5'ylscp2-NdeI (2) y 3'ylscp2-BamHI (3).

Con el fin de clonar el gen en un vector de expresión, fue realizada una amplificación por PCR a partir del ADN genómico, esta vez con los dos oligonucleótidos iniciadores que agregan sitios de corte para enzimas de restricción (5'ylscp2-NdeI y 3'ylscp2-BamHI). El producto de PCR fue clonado en el vector pET-9b con las enzimas *Nde I* y *Bam HI*, generando el plásmido pET9bYLSCP2 (Figura 5). Finalmente, el pET9bYLSCP2 fue transformado en células competentes de *E. coli* BL21DE3.

2.1.b. Expresión recombinante

El nivel de expresión de varios stocks de *E. coli* BL21 (DE3) conteniendo el vector pET9bYLSCP2 fue analizado con el fin de obtener un clon adecuado para la expresión de YLSCP2. El clon 4I fue seleccionado luego del análisis del nivel de expresión de proteínas de cultivos a pequeña escala (Figura 6). La mayor cantidad de proteína producida es obtenida después de 3 horas de inducción con IPTG 1 mM o lactosa 1 % y la localización intracelular de YLSCP2 es en la fracción insoluble (Figura 6) como cuerpos de inclusión (CI). Este resultado es frecuente en la expresión de proteínas heterólogas en *E. coli* debido en parte a la alta velocidad de expresión [105].

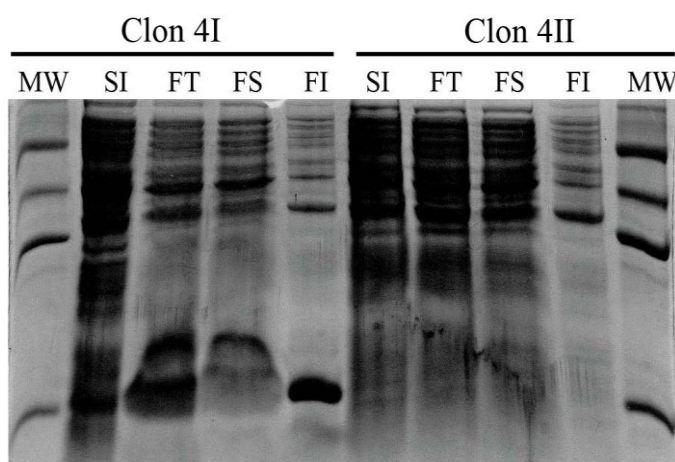


Figura 6. Ensayo de inducción y localización de YLSCP2 (13.9 kDa). Fueron analizadas las fracciones sin inducir (SI), fracción total (FT), fracción soluble (FS) y fracción insoluble (FI). El marcador de peso molecular (MW) corresponde a las masas de 66, 44, 30 y 14 kDa (de arriba hacia abajo).

Los cultivos a gran escala fueron preparados partiendo siempre del mismo stock conservado a - 80 °C. Luego de una inducción de 3 horas con lactosa 1 %, las bacterias expresan YLSCP2 con alto rendimiento (6 mg YLSCP2 / L de cultivo).

2.1.c. Purificación

La purificación de YLSCP2 fue realizada por cromatografía de intercambio catiónico a partir de cuerpos de inclusión (CI). El valor del punto isoeléctrico (pI) de YLSCP2 determinado por electroisoelectroforesis es mayor que 8.9, mientras que el valor teórico es ~ 10 (obtenido a partir de la secuencia, Figura 7). Durante la purificación fue utilizado el Buffer A (acetato de sodio 25 mM, pH 5.5, urea 8 M, glicina 10 mM), el cual tiene urea para disolver las proteínas de los CI y un pH adecuado para que la proteína tenga una carga positiva significativa que la retenga en la matriz SP-Sepharose durante la

cromatografía. Las proteínas cargadas en la matriz fueron liberadas mediante lavados con soluciones de concentración creciente de cloruro de sodio (Figura 8A). Las fracciones que contienen YLSCP2 fueron dializadas contra Buffer B (fosfato de sodio 50 mM, pH 7.0) para renaturalizar la proteína y la muestra obtenida finalmente presenta > 95 % de pureza (Figura 8B). Este procedimiento de purificación de la proteína en su forma desnaturalizada es favorable para evitar la unión de lípidos endógenos de *E. coli* en la producción de proteína. La concentración de YLSCP2 fue determinada rutinariamente a partir de la absorbancia a 280 nm, utilizando un coeficiente de extinción molar de $6986 \pm 41 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (determinado a partir de 3 medidas independientes) [106].

```

1  MSLKVDGFTS  SIIFDVIRDG  LNDPSQAKQK  AESIKKANAI  IVFNLKNKAG
51  KTESWYLDLK  NDGDVGKGNK  SPKGDADIQL  TLSDDHFQQL  VEGKANAQRL
101 FMTGKLKVKG  NVMKAAAIEG  ILKNAQNNL

```

Figura 7. Secuencia aminoacídica de YLSCP2 (129 aminoácidos), indicando los aminoácidos aromáticos (negrita) y la secuencia PST1 de direccionamiento (subrayado).

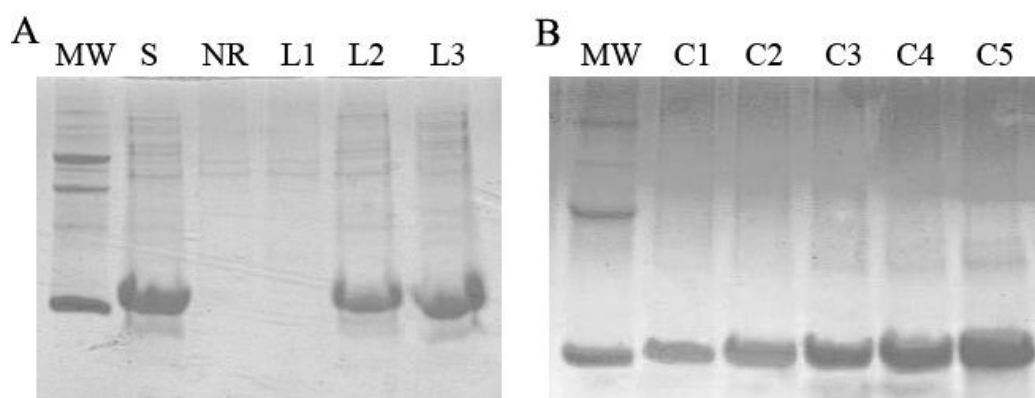


Figura 8. SDS-PAGE de los ensayos de purificación (A) y pureza (B) de YLSCP2. Las muestras corresponden a las fracciones de siembra (S), no retenido (NR), lavado con NaCl 0 M (L1), lavado con NaCl 0.15 M (L2), lavado con NaCl 0.5 M (L3) y a muestras con 2, 4, 8, 10 y 15 µg totales de YLSCP2 (C1-C5). Los marcadores de peso molecular (MW) tienen proteínas de 66, 44, 32 y 14 kDa, de arriba hacia abajo.

El peso molecular de YLSCP2 fue determinado mediante espectrometría de masa ($13903 \pm 1.5 \text{ Da}$) y el péptido **SLKVDG** fue detectado mediante secuenciación N-terminal. Tanto la secuencia N-terminal obtenida como la diferencia de 131 Da observada entre el peso molecular experimental y el esperado para YLSCP2 (14034 Da, Figura 7) concuerda con la eliminación del residuo inicial de metionina (131.2 Da) durante la expresión en *E. coli*. Estos resultados confirman el peso molecular y la identidad de YLSCP2.

2.II. Espectroscopia UV-VIS

2.II.a. Espectroscopia de cuarta derivada

Los aminoácidos aromáticos de las proteínas (fenilalanina, tirosina y triptofano) absorben luz en la región ultra-violeta (UV) y las posiciones de sus bandas espectrales son sensibles a la conformación proteica. Sin embargo, la información estructural que contienen estos espectros no se obtiene directamente debido a la baja resolución de las bandas de absorción. La espectroscopia de cuarta derivada es un procesamiento para extraer esta información calculando las derivadas de los espectros. Este procesamiento aumenta significativamente la resolución efectiva del espectro original porque las bandas anchas tienden a desaparecer y los componentes agudos aumentan. En la derivación de orden cuatro, los máximos y mínimos coinciden con los máximos y mínimos del espectro original y su amplitud es inversamente proporcional a la cuarta potencia del ancho de la banda original [107]. Es por esto que la espectroscopia de cuarta derivada es una herramienta valiosa para la caracterización estructural de las proteínas.

El entorno de los residuos aromáticos de YLSCP2 fue analizado mediante espectroscopia de cuarta derivada (Figura 9). El espectro correspondiente al estado desplegado fue simulado como la suma de los espectros UV de los aminoácidos en solución en la proporción en la que se encuentran en YLSCP2. Los residuos de fenilalanina presentan bandas entre las longitudes de onda de 245 - 270 nm, mientras que el residuo de tirosina lo hace entre 270 - 285 nm y el de triptofano a longitudes de onda mayores que 290 nm [107]. En el espectro de cuarta derivada de YLSCP2 los máximos y mínimos presentan un corrimiento de 2 - 3 nm hacia longitudes de onda mayores con respecto al estado desplegado simulado (Figura 9). Este tipo de corrimiento indica que los residuos aromáticos de YLSCP2 se encuentran en un ambiente no polar, sugiriendo que la proteína se está bien plegada.

2.III. Contenido de estructura secundaria

2.III.a. Espectros de dicroísmo circular en el UV-lejano

Los cromóforos más abundantes en péptidos y proteínas son los grupos amida de los enlaces peptídicos. Estos grupos poseen tres orbitales π involucrados en diferentes transiciones ($\pi \rightarrow \pi^*$ y $n \rightarrow \pi^*$). La absorción de luz circularmente polarizada por estos cromóforos presenta máximos de longitud de onda de absorción sensibles al ambiente y varía según el tipo de estructura secundaria. Por esto, el espectro de dicroísmo circular (CD) de YLSCP2 en el UV-lejano fue utilizado para determinar el tipo y contenido de estructura secundaria de la proteína (Figura 10). El espectro presenta dos mínimos

centrados a 220 y 208 nm (transiciones $n\pi^*$ y $\pi\pi^*$, respectivamente) y un máximo centrado a 194 nm (transición $\pi\pi^*$). Estos valores son característicos de una estructura principalmente α -helicoidal y coinciden con los reportados para otros miembros de las SCP2 [96][97].

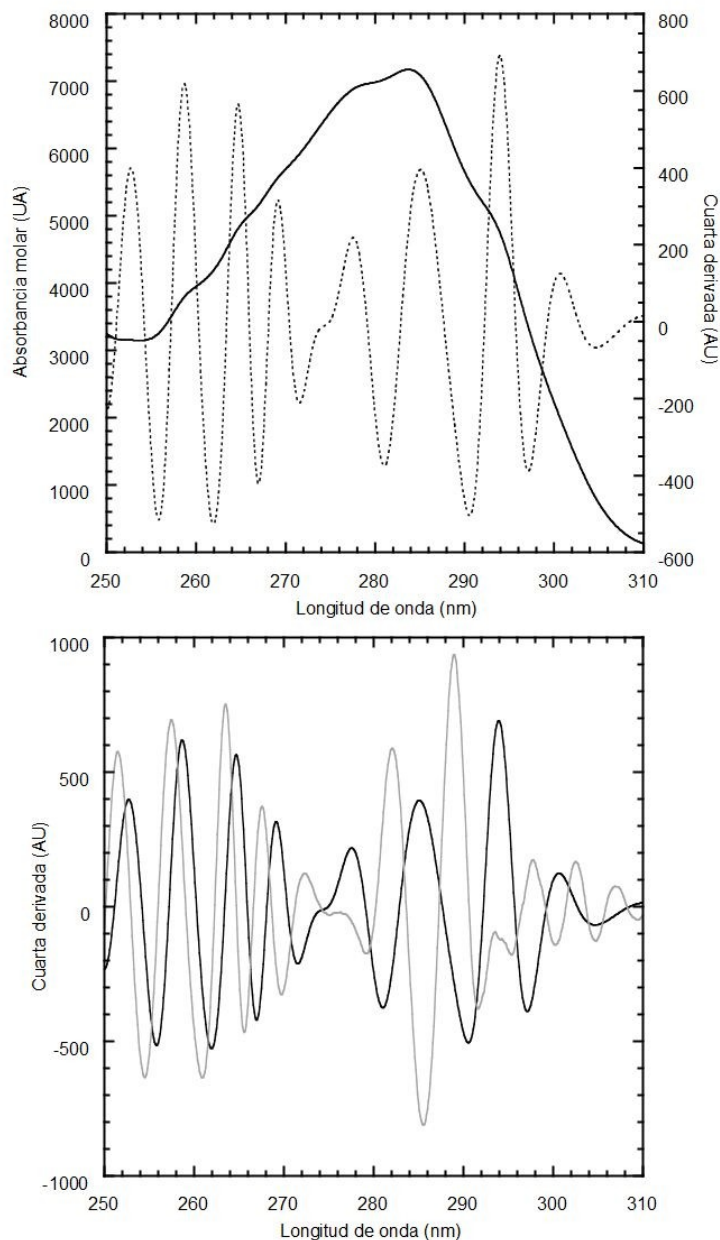


Figura 9. Espectroscopia de cuarta derivada de YLSCP2 ($\sim 70 \mu\text{M}$). Comparación de los espectros de absorbancia (línea llena) y cuarta derivada (línea punteada) de YLSCP2 (panel superior) y de los espectros de cuarta derivada del estado nativo (negro) y el estado desplegado simulado (gris) de la proteína (panel inferior).

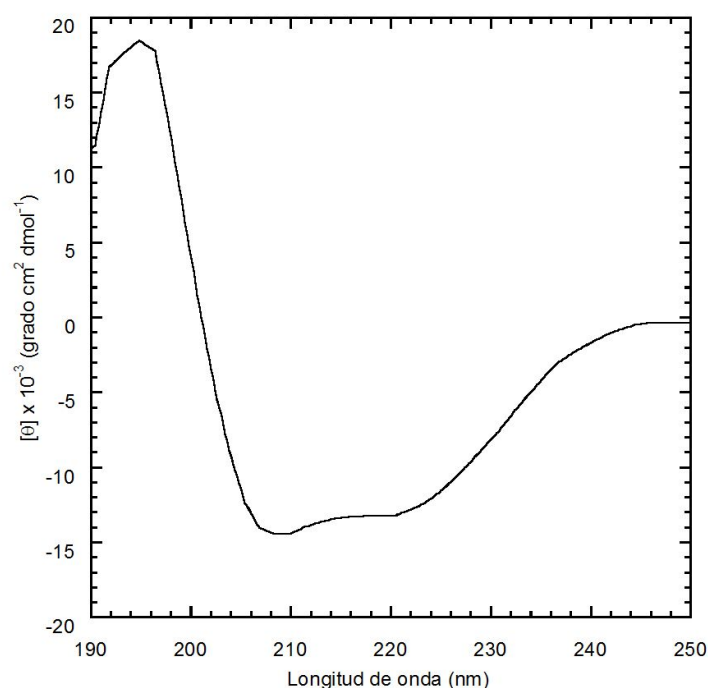


Figura 10. Espectros de dicroísmo circular de YLSCP2 (~ 5 μ M) en el UV-lejano.

Existen dos métodos generales para evaluar el contenido de estructura secundaria de una proteína a partir de su espectro de CD en el UV-lejano. La diferencia entre ellos es la base de datos de espectros que se utilizan como estándar, la cual puede ser de péptidos o de proteínas con estructura conocida. Estos espectros estándar se comparan con el de la proteína deseada mediante análisis de diferencia de cuadrados, análisis de componentes principales, métodos de consistencia, análisis de red neural, etc. El contenido de estructura secundaria de YLSCP2 fue determinado a partir del espectro de CD con el paquete de programas incluidos en DICROPROT [108]. El resultado indica que la proteína posee un 28-39% de α -hélice y un 11-22% de hoja- β , valores similares a los observados en los modelos cristalográficos de las SCP2 (36-41% de α -hélice y 25-28% de hoja- β [86][89][90][84][94][65]) y a los determinados por CD de otros miembros de las SCP2 [96][97]. Estos resultados indican que YLSCP2 presenta la estructura secundaria típica de la familia de las SCP2 y que el espectro de CD en el UV-lejano es una herramienta adecuada para analizar la estructura secundaria de esta proteína.

2.IV. Contenido de estructura terciaria

2.IV.a. Espectros de dicroísmo circular en el UV-cercano

Como consecuencia de la asimetría del entorno proteico las cadenas laterales aromáticas contribuyen al espectro de CD en el UV-cercano [109]. El espectro de CD en el UV-cercano de YLSCP2 demuestra que la estructura terciaria es ordenada y presenta una asimetría rígida en los alrededores de los residuos aromáticos (Figura 11). En el rango de 264-270 nm se puede observar una estructura vibracional producida por los residuos de fenilalanina, mientras que la tirosina y el triptofano originan bandas a ~ 285, 290 y 296 nm. Este espectro de CD en el UV-cercano es el primero y el único reportado hasta el momento para una proteína de la familia de las SCP2.

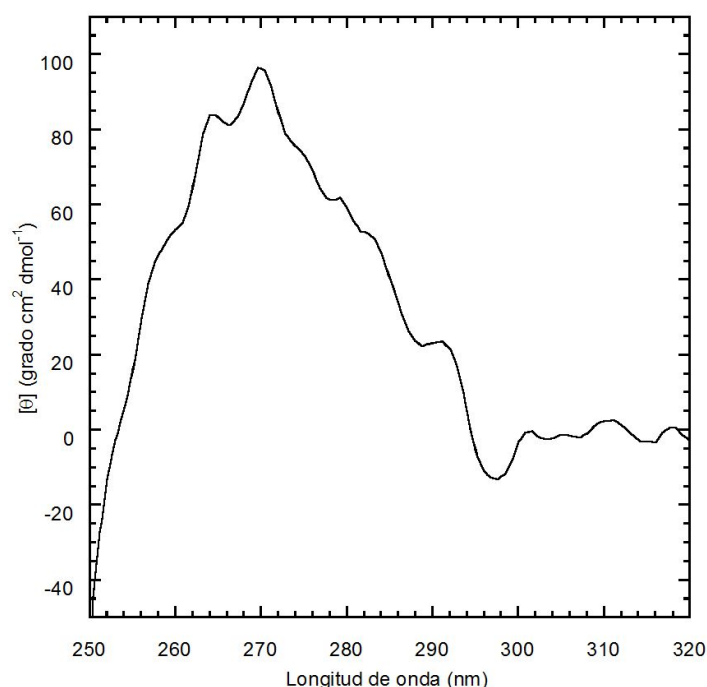


Figura 11. Espectro de dicroísmo circular de YLSCP2 (~ 30 μM) en el UV-cercano.

2.IV.b. Espectros de fluorescencia de triptofano

La fluorescencia de los residuos aromáticos de las proteínas funciona como sonda de la conformación estructural. El espectro de fluorescencia de YLSCP2 presenta un máximo de emisión centrado en una longitud de onda de 326 nm, luego de una excitación a una longitud de onda de 290 nm. En comparación con el espectro de fluorescencia del triptofano libre, el espectro de YLSCP2 tiene una mayor intensidad de emisión y la longitud de onda del máximo

presenta ~ 30 nm de corrimiento (Figura 12, panel superior). En YLSCP2 los residuos de triptofano y de tirosina se encuentran contiguos en la secuencia (Trp55 y Tyr56, Figura 7). El comportamiento de la intensidad de emisión de fluorescencia en función de la longitud de onda de excitación presenta un máximo entre 280 - 295 nm, sugiriendo que el triptofano contribuye en mayor proporción a la señal de fluorescencia (Figura 12, panel inferior). Más aún, estos resultados indican que el triptofano se encuentra oculto al solvente en un ambiente no-polar, sugiriendo que YLSCP2 se encuentra correctamente plegada.

2.IV.c. Atenuación de la fluorescencia del triptofano

El ensayo de atenuación de fluorescencia de YLSCP2 con acrilamida fue realizado para confirmar los resultados de fluorescencia obtenidos que indican que el triptofano se encuentra oculto al solvente (Figura 13, panel superior). La intensidad del espectro de fluorescencia de triptofano de YLSCP2 disminuye lentamente con el agregado de acrilamida, sin cambios en la longitud de onda del máximo de emisión. En cambio, la misma cantidad de acrilamida reduce rápidamente y por completo la intensidad de fluorescencia de una solución de triptofano. La relación entre la fluorescencia inicial y la fluorescencia atenuada (F_0/F) en función de la concentración de acrilamida presenta una forma lineal, sugiriendo la presencia de un único mecanismo de atenuación (Figura 13, panel inferior). La constante de decaimiento obtenida es mucho menor para YLSCP2 (3.1 M^{-1}) que para el triptofano libre (31.2 M^{-1}), indicando que el residuo de triptofano de YLSCP2 se encuentra oculto al solvente. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos del análisis de la fluorescencia del triptofano y con los reportados para otros miembros de las SCP2 [103][100][101].

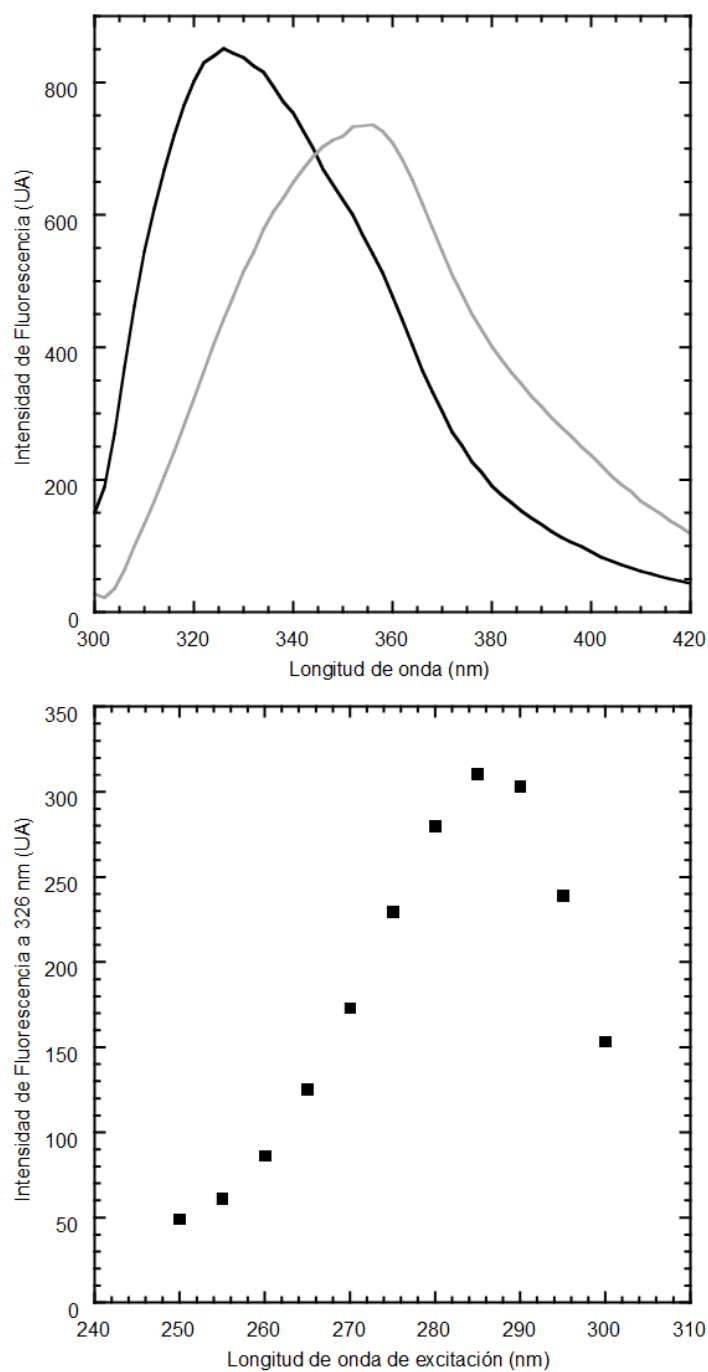


Figura 12. Espectros de fluorescencia de YLSCP2 $\sim 5 \mu\text{M}$ (negro) en comparación con triptofano libre $\sim 5 \mu\text{M}$ (gris), luego excitar a una longitud de onda de 290 nm (panel superior) y comportamiento de la intensidad de fluorescencia de YLSCP2 a 326 nm en función de la longitud de onda de excitación (panel inferior).

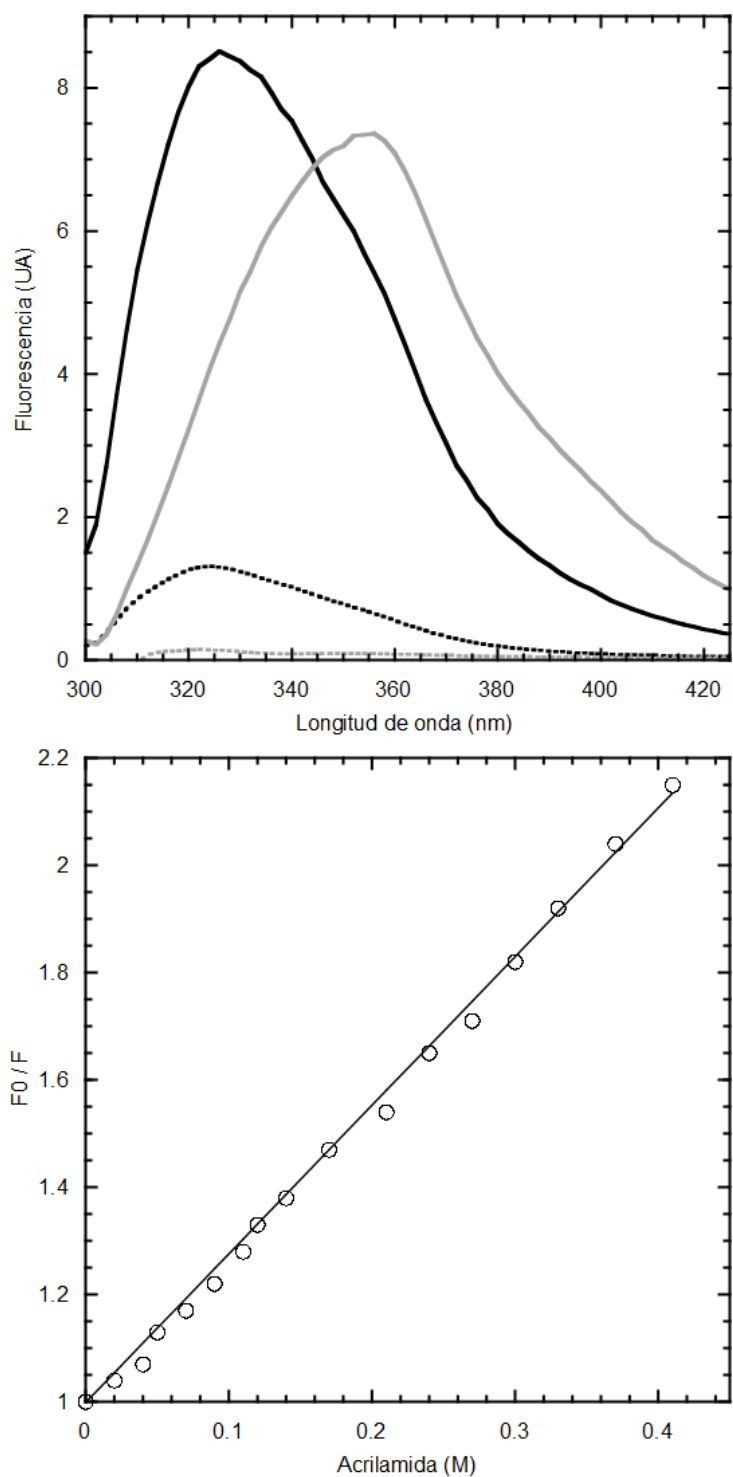


Figura 13. Espectros de fluorescencia de YLSCP2 ~ 5 μ M sola (línea negra) y con acrilamida (línea punteadas negra) y de triptofano libre ~ 5 μ M sólo (línea gris) y con acrilamida (línea punteadas gris), luego de una excitación a una longitud de onda de 290 nm (panel superior). Atenuación de la fluorescencia de YLSCP2 ~ 5 μ M a 326 nm

(círculos blancos) en función de la concentración de acrilamida y el ajuste (línea) de la ecuación de Stern-Volmer (panel inferior).

2.V. Estado de agregación

2.V.a. Propiedades hidrodinámicas

El estado de agregación de YLSCP2 (30 μ M, Buffer B, 20 °C) fue determinado mediante cromatografía de exclusión molecular analítica seguida por absorbancia-UV (Figura 14) [110]. El perfil de fracciones obtenido indica que la muestra es una población mono-dispersa de moléculas con un radio de Stokes (R_S) de 21.1 Å. Este valor es similar a los valores de R_S reportados para otros miembros de las SCP2 [103][100][96]. El valor de R_S para una proteína esférica del tamaño de YLSCP2 en estado monomérico es 18.8 Å y en estado dimérico es 24.2 Å [110]. El R_S de YLSCP2 sugiere que la proteína se encuentra como un monómero expandido en solución o que su estructura no tiene forma esférica. Esta última posibilidad es bastante probable, ya que las estructuras reportadas para las SCP2 presentan forma elipsoidal [86][89][90].

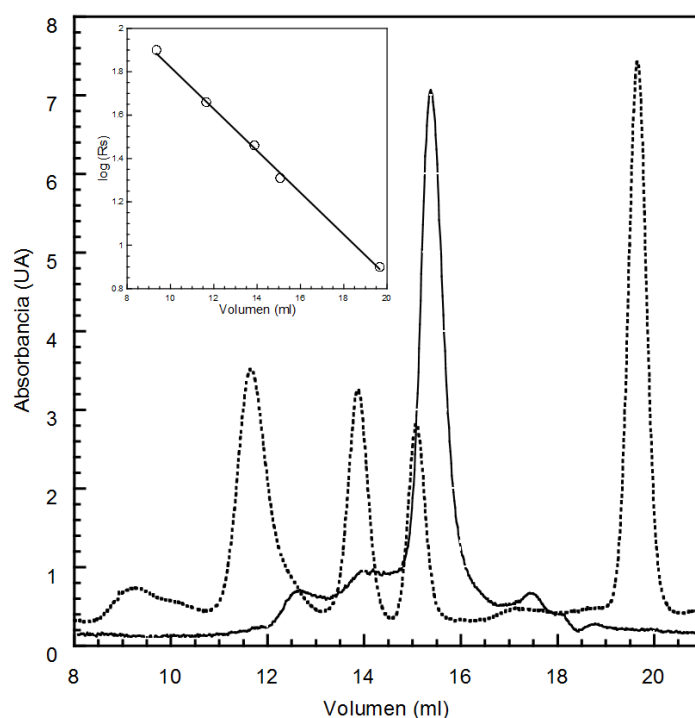


Figura 14. Cromatografía de exclusión molecular de YLSCP2 30 μ M (línea llena), La corrida de calibración (línea punteada) fue realizada con tiroglobulina (670 kDa), globulina bovina (150 kDa), ovoalbumina de gallina (44 kDa), mioglobina equina (17 kDa) y vitamina B12 (1.35 kDa). La relación entre el $\log(R_S)$ y el volumen es de tipo lineal (círculos blancos, inserto) y el ajuste (línea, inserto) fue utilizado para calcular el peso molecular de YLSCP2.

También fue realizado un ensayo de cromatografía de exclusión molecular de

YLSCP2 (250 μ M, Buffer B, 20 °C) utilizando simultáneamente detectores de absorbancia-UV y de dispersión de luz (Figura 15) [111]. El resultado muestra un pico correspondiente a un radio hidrodinámico de 16.0 ± 0.5 Å, un peso molecular de 14100 ± 700 Da, un coeficiente de difusión traslacional de $1.52 \pm 0.11 \times 10^{-8}$ cm² s⁻¹ y un coeficiente de poli-dispersidad de 1.011 ± 0.071 . Aunque la proteína fue sembrada en la matriz a una concentración alta, durante la cromatografía la muestra se diluye aproximadamente 10 veces, por lo que el detector en realidad analiza una muestra de YLSCP2 ~ 25 μ M. Por lo tanto, este resultado confirma que YLSCP2 se encuentra en forma de monómero a bajas concentraciones.

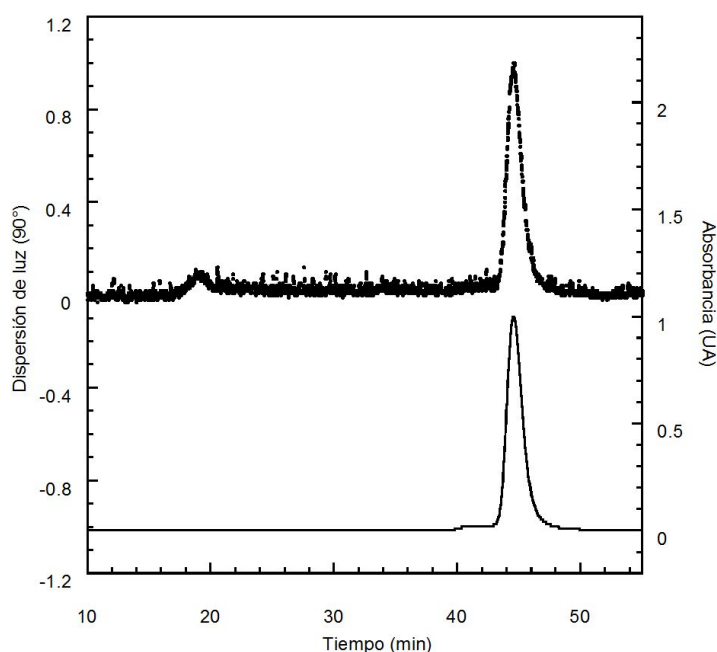


Figura 15. Cromatografía de exclusión molecular de YLSCP2 ~ 25 μ M seguida por absorbancia a 280 nm (línea) y dispersión de luz a 90° (puntos).

2.V.b. Dispersión de rayos-X a bajo ángulo

La dispersión de rayos-X a bajo ángulo (SAXS) permite determinar inhomogeneidades en la densidad electrónica de partículas en solución que con dimensiones entre 10 - 1000 Å. Las aplicaciones de esta técnica cubren un amplio rango de campos, entre los que se encuentra el estudio de macromoléculas biológicas. Los perfiles de intensidad de dispersión SAXS (I/Q) en función del ángulo de dispersión (Q) contienen información del tamaño y forma de las partículas en estudio, así como también de la interacción entre ellas. La forma del espectro de SAXS de una partícula aislada a valores de Q pequeños puede ser aproximada a una curva del tipo "Gaussiana" (la

intensidad de dispersión varía según Q^4). Este análisis, denominado "aproximación de Guinier", permite determinar el radio de giro (RG) de la partícula en estudio a partir de la pendiente en un gráfico del logaritmo natural de la intensidad de dispersión ($\ln I/Q$) en función de Q^2 [112]. Esta aproximación es válida hasta valores de $Q \times RG$ de 0.1 y sólo se puede aplicar a espectros de SAXS de soluciones mono-dispersas. Otra forma de obtener el valor del RG es calculando la función de densidad de pares, con la cual es posible utilizar espectros de muestras poli-dispersas. Por otro lado, el comportamiento de la intensidad de dispersión a valores grandes de Q varía según Q^{-2} . Como consecuencia, el gráfico de $I/Q \times Q^2$ en función de Q , conocido como el "gráfico de Kratky", adquiere una forma de campana para una partícula con forma esférica cuyo máximo depende del RG . Si la partícula en estudio tiene una forma de cadena "Gaussiana", el "gráfico de Kratky" no presenta forma de campana sino de meseta a valores grandes de Q . En conjunto, este tipo de análisis y aproximaciones de los perfiles de SAXS permite obtener el radio de giro y el grado de globularidad de proteínas en solución.

Para una proteína compacta del tamaño de YLSCP2 (128 aminoácidos) el valor de RG esperado es de 14.7 Å para un monómero y 18.5 Å para un dímero [113]. El radio de giro (RG) obtenido a partir del análisis de la "aproximación de Guinier" del espectro de SAXS de YLSCP2 ($\sim 200 \mu\text{M}$) es 18.5 ± 0.7 Å, indicando que YLSCP2 se encuentra como dímero. Los espectros de SAXS fueron realizados en función de la concentración de proteína (30 - 200 μM) para estudiar la asociación de YLSCP2 (Figura 16). La forma del espectro SAXS de YLSCP2 cambia notablemente en función de la concentración, sugiriendo una conversión entre distintas especies proteicas (Figura 16, panel superior). El RG y el grado de globularidad fueron obtenidos para cada espectro a partir de la función de densidad de pares y "el gráfico de Kratky", respectivamente (Tabla II y Figura 16 y 17). A medida que aumenta la concentración de proteína, el RG aumenta desde un valor un poco mayor al esperado para el monómero hasta un valor un poco menor al esperado para el dímero. La forma acampanada de la curva de Kratky indica que las especies de YLSCP2 presentes poseen forma globular, excepto la muestra de baja concentración donde la intensidad de la señal es demasiado baja. Estos resultados muestran un equilibrio de oligomerización de YLSCP2 de al menos monómero a dímero.

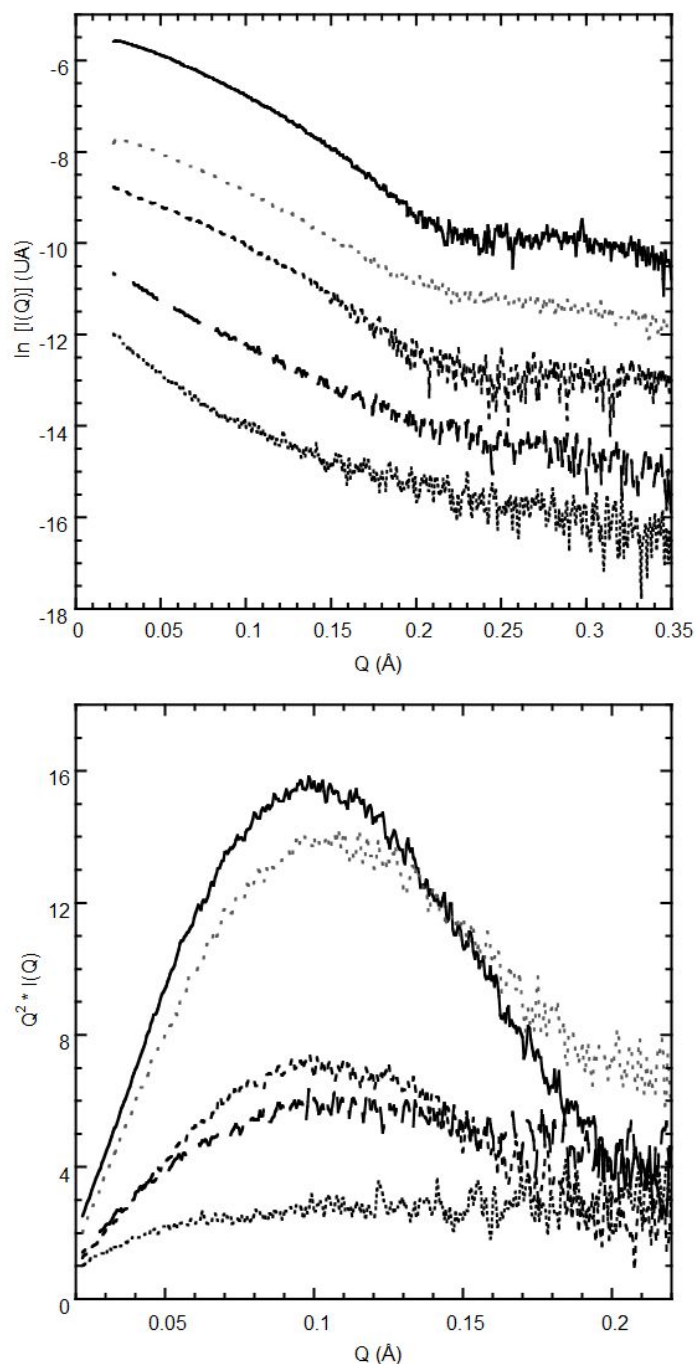


Figura 16. Espectros de dispersión de luz a bajo ángulo de YLSCP2 en función de la concentración de proteína (panel superior) y el "gráfico de *Kratky*" obtenido para cada uno de los espectros (panel inferior). La concentración de proteína de los espectros es 195 (línea negra), 162 (línea de puntos gris), 112 (línea de rayas chicas), 65 (línea de rayas grandes) y 32 μM (línea de puntos negros).

Tabla II. Radio de giro de YLSCP2 promedio.

YLSCP2 (μM)	R_G ($\text{\AA}$)
32	15.4
65	16.2
112	16.7
162	16.8
195	17.1

Los espectros de SAXS en función de la concentración de YLSCP2 fueron procesados mediante un análisis de componentes principales [114]. La mejor reconstrucción de los diagramas SAXS se obtuvo utilizando 3 componentes, lo que sugiere la existencia de varias especies en equilibrio. El valor del radio de giro del componente mayoritario se corresponde con el dímero de YLSCP2. A medida que aumenta la concentración de proteína el radio de giro promedio de las especies presentes aumenta desde un valor cercano al esperado para el monómero hasta un valor un poco menor que el esperado para el dímero (Figura 17). Estos resultados indican que la dimerización de YLSCP2 ocurre entre el rango concentraciones de proteína de 80 a 140 μM .

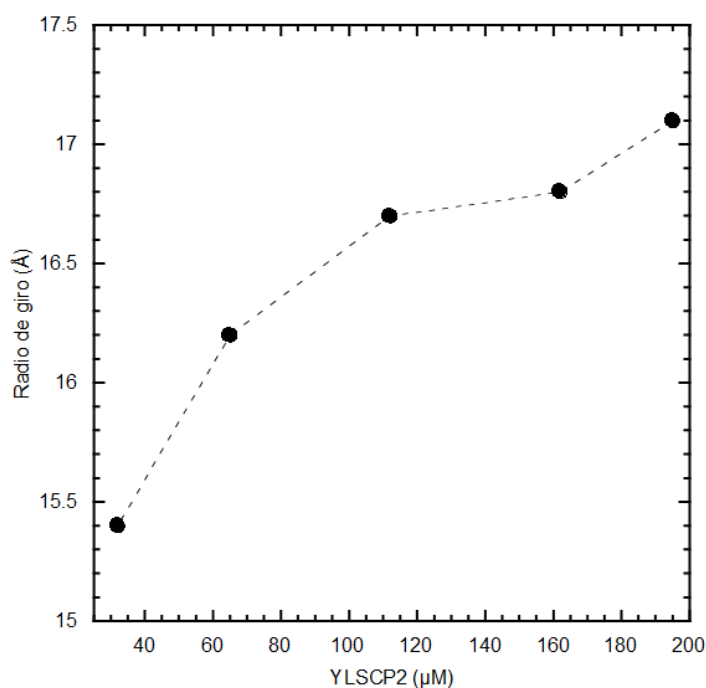


Figura 17. Radio de giro promedio de YLSCP2 (círculos negros) en función de la concentración de proteína.

2.V.c. Reacción de YLSCP2 con agentes "entrecruzadores"

El entrecruzado químico de proteínas es un método que puede identificar interacciones estables o proximidad entre proteínas. Esta técnica está basada en la formación de enlaces covalentes entre dos proteínas por medio de un agente de entrecruzado. Estos agentes tienen al menos dos grupos reactivos en los extremos de un brazo espaciador que reaccionan con los grupos funcionales de los residuos de las proteínas. La naturaleza química de estos agentes de entrecruzado varía según el tipo de grupo funcional de la proteína que se desea unir (aminas primarias, sulfidrilos, etc.) y el largo del brazo espaciador.

La dimerización de YLSCP2 fue estudiada mediante ensayos de entrecruzado químico con glutaraldehído, un agente de entrecruzado homo-bifuncional de grupos aminos que tiene grupos aldehído en los extremos de un brazo espaciador de 3 carbonos (distancia 4.1 Å). Los productos de la reacción de entrecruzamiento varían con la concentración de proteína y el tiempo de reacción (Figura 18). Al menos tres tipos de oligómeros de YLSCP2 se detectan a partir de 40 μM de proteína y también se observan productos de reacción no-específicos (agregados de más de 44 kDa). Las tres especies detectadas concuerdan con el peso molecular para el monómero (14 kDa), dímero (~ 30 kDa) y trímero (~ 40 kDa) de YLSCP2. En la muestra más concentrada ($\sim 230 \mu\text{M}$), el monómero desaparece luego de un minuto de reacción, mientras que en la muestra de menor concentración ($\sim 40 \mu\text{M}$) el monómero se sigue detectando después de 10 minutos de reacción. Estos resultados confirman que YLSCP2 forma agregados de mayor peso molecular, pero la baja especificidad de la reacción no permite determinar de forma adecuada cual es la especie principal.

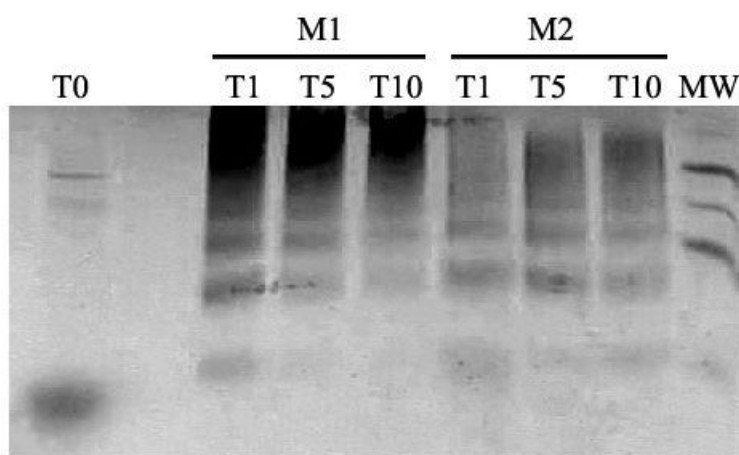


Figura 18. SDS-PAGE del entrecruzamiento de YLSCP2 con glutaraldehído. Utilizamos dos muestras de proteína con diferentes concentraciones (M1: YLSCP2 $\sim 230 \mu\text{M}$, M2: YLSCP2 $\sim 40 \mu\text{M}$). T0: control de reacción; T1: 1 minuto de reacción, T5: 5 minutos de reacción, T10: 10 minutos de reacción, MW: marcadores de peso molecular (de arriba hacia

abajo: 66, 44.3, 32, 14.3 kDa).

Para obtener mayor especificidad en la reacción de entrecruzamiento fue seleccionado como de entrecruzado el disuccinimidil suberato (DSS). El DSS es un agente homo-bifuncional que contiene un grupo N-hidroxisuccinimidil ester que reacciona con grupos aminos en ambos extremos de un brazo espaciador de 8 carbonos (distancia 11.4 Å). El resultado de la reacción indica que el dímero de YLSCP2 se forma a concentraciones mayores que 70 μM (Figura 19). Con este método se obtienen menos productos, la eficiencia de entrecruzado es baja y no se observa la desaparición completa del monómero.

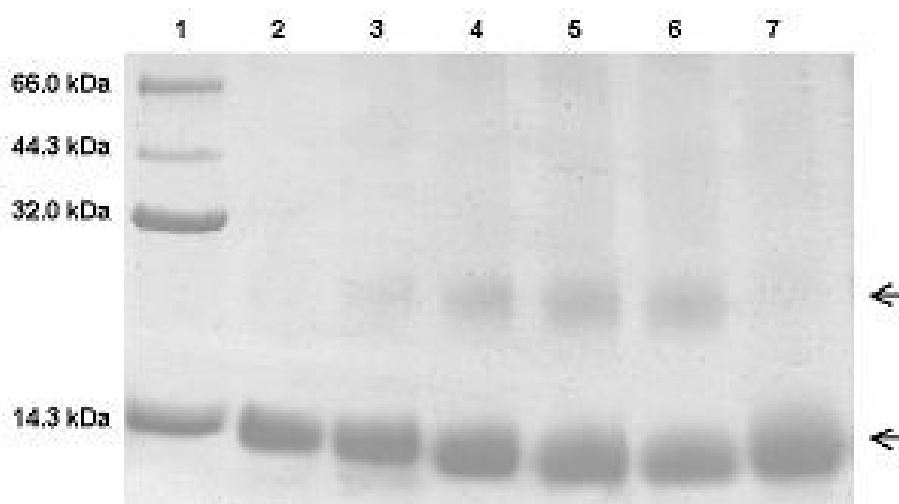


Figura 19. Reacción de entrecruzamiento con DSS de YLSCP2 20, 35, 70, 110 y 160 μM (líneas 2-6) analizado por SDS-PAGE 10%. La línea 7 es el control de reacción y la línea 1 es el marcador de peso molecular. Las flechas indican la posición del monómero (abajo) y el dímero (arriba) de YLSCP2.

2.V.d. Anisotropía de fluorescencia

Los fluoróforos absorben de forma preferencial los fotones que poseen vectores eléctricos alineados paralelamente con su momento de transición, el cual tiene una orientación definida con respecto a los ejes moleculares. Luego de una excitación con luz polarizada, sólo son excitados los fluoróforos que tienen su momento de transición paralelo al vector eléctrico. La rotación del fluoróforo durante el tiempo de vida del estado excitado produce una emisión de fluorescencia parcialmente polarizada, la cual se mide en términos de anisotropía o polarización de fluorescencia. El ángulo relativo entre los momentos de polarización de la excitación y la emisión (β) permite calcular la anisotropía máxima (A_0), la cual depende de la longitud de onda de excitación. De esta forma, el

fenómeno de anisotropía de fluorescencia otorga información sobre el tamaño de los fluoróforos, a partir de la relación entre la rotación y el volumen. Como consecuencia, la anisotropía de fluorescencia es utilizada normalmente en bioquímica de proteínas ya que la misma provee información sobre el tamaño y la forma de las proteínas y sobre la rigidez del entorno molecular de los residuos aromáticos.

Los ensayos de anisotropía de fluorescencia fueron realizados para profundizar la caracterización del estado de agregación de YLSCP2. Para estos ensayos fue utilizado un filtro wg 320 (corte en 320 nm) para eliminar la señal correspondiente a la dispersión de luz de la muestra. Los valores de anisotropía de fluorescencia de YLSCP2 en función de la longitud de onda de excitación (λ_{exc}) fueron comparados con los obtenidos para la emisión de fluorescencia (Figura 20). Los resultados muestran que cuando la λ_{exc} está entre 260 - 290 nm el valor de anisotropía de fluorescencia es constante, mientras que se observa un mínimo a una λ_{exc} de 280 nm y un aumento de la anisotropía de fluorescencia a una λ_{exc} de 295 nm. Este espectro de anisotropía de fluorescencia es similar al reportado para otras proteínas [115]. Los valores constantes de anisotropía de fluorescencia son esperables cuando la señal deriva de una única transición electrónica, como en el caso de la tirosina. En cambio el triptofano posee dos transiciones electrónicas involucradas en la fluorescencia (1La y 1Lb). La contribución desigual de estas transiciones origina el mínimo de anisotropía de fluorescencia de YLSCP2 observado a 280 nm y el aumento observado a 295 nm [116].

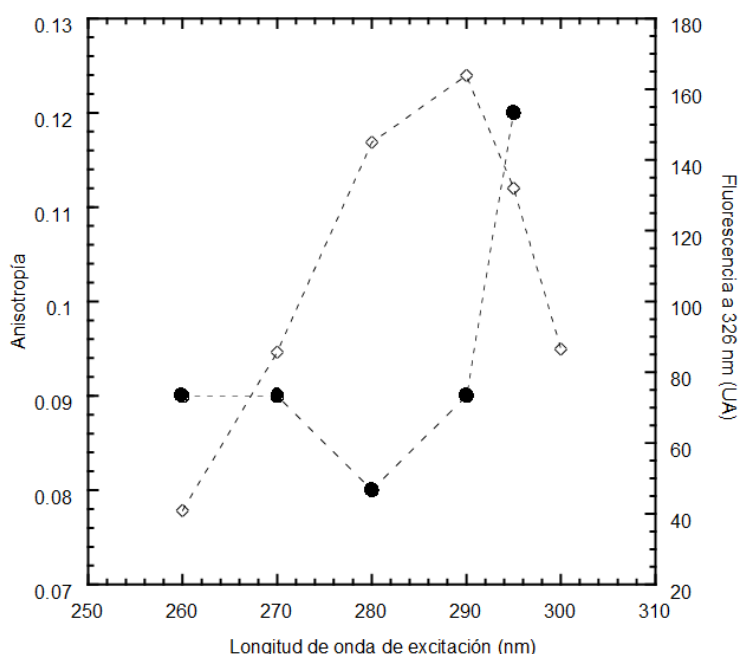


Figura 20. Intensidad de fluorescencia a 326 nm (rombos blancos) y anisotropía de

fluorescencia (círculos negros) de YLSCP2 ~ 15 μM en función de la longitud de onda de excitación. Las líneas punteadas se representan para facilitar la interpretación del gráfico.

La dependencia de la anisotropía de fluorescencia de YLSCP2 con la viscosidad fue analizada para calcular el volumen de la proteína (Figura 21). Para esto fue medida la anisotropía de fluorescencia YLSCP2 en función de la concentración de sacarosa a una λ_{exc} de 295 nm. Los resultados muestran un aumento de los valores de la anisotropía de fluorescencia de YLSCP2 (~ 4 μM) con el aumento de la viscosidad. El ajuste de la ecuación de Perrin a los resultados fue realizado para calcular el volumen de YLSCP2, suponiendo un tiempo de vida media de fluorescencia de 3 ns (ver Capítulo VI) [117]. El valor de anisotropía fundamental de fluorescencia obtenido se corresponde con un ángulo β de 40° y un volumen aparente de YLSCP2 de 39,21 nm³. El radio hidrodinámico calculado a partir de este volumen es de 21.08 Å, el cual es casi idéntico al obtenido por cromatografía de exclusión molecular (21.1 Å). Este resultado confirma que YLSCP2 se encuentra como monómero a baja concentración de proteína, pero también demuestra que el residuo de triptofano se encuentra en una posición fija en la estructura proteica y rota de la misma forma que la proteína completa.

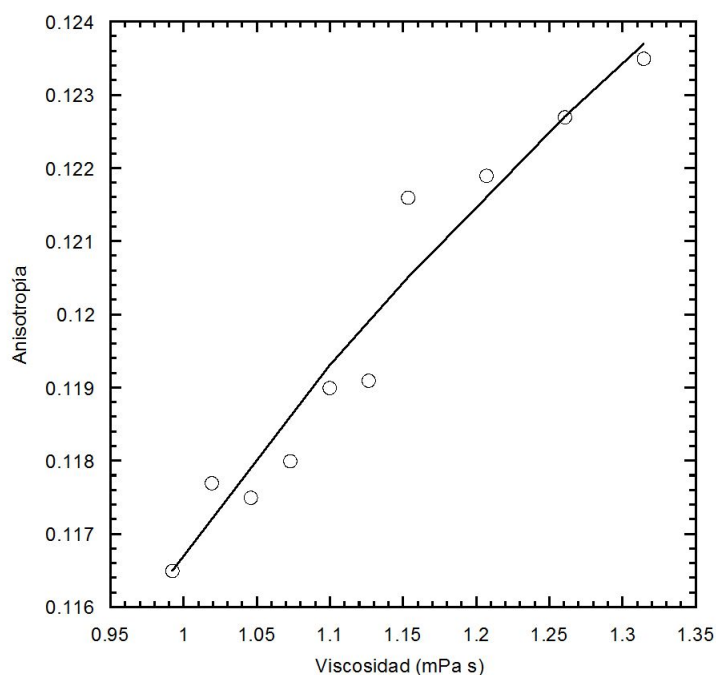


Figura 21. Anisotropía de fluorescencia de YLSCP2 ~ 4 μM (círculos blancos) en función de la viscosidad junto con el ajuste de la ecuación de Perrin (línea).

El comportamiento de la anisotropía de fluorescencia de YLSCP2 en función de la concentración de proteína fue analizado utilizando una λ_{exc} de 260 nm (Figura 22). Los valores obtenidos muestran un leve incremento de la anisotropía con el aumento de la

concentración de proteína entre 80 - 150 μM , el cual podría deberse a la dimerización. Sin embargo, es necesario realizar más experimentos para obtener información concluyente.

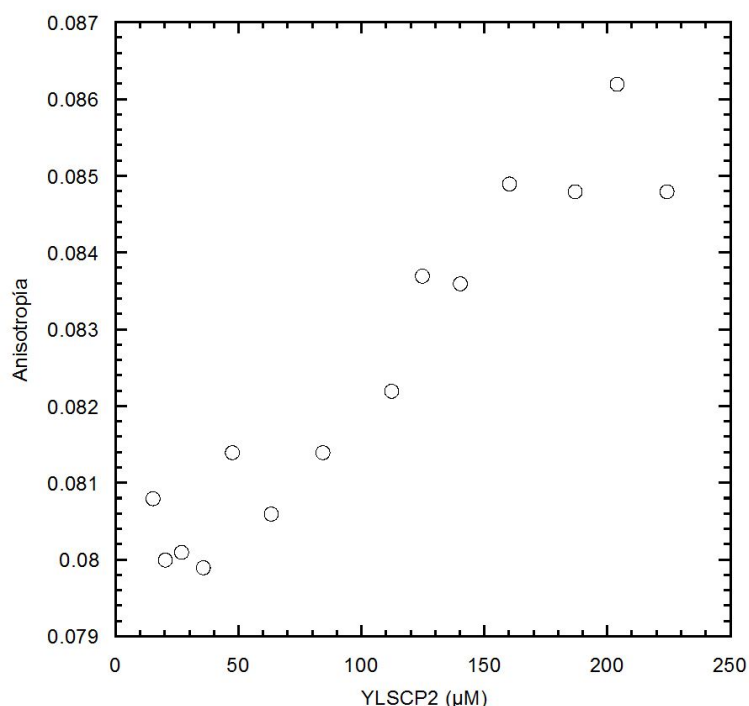


Figura 22. Anisotropía de fluorescencia de YLSCP2 (círculos blancos) en función de la concentración de proteína, luego de excitar con una longitud de onda de 260 nm.

2.VI. Análisis bioinformático

2.VI.a. Análisis de la secuencia aminoacídica de YLSCP2

Las proteínas SCP2 evolucionaron a través de eventos de fusión y fisión, los cuales permitieron la formación de una gran variedad de proteínas multidominio y de dominio único [13]. La secuencia de YLSCP2 es de dominio único, al igual que otras SCP2 de levaduras [13] y su secuencia de aminoácidos consta de 129 residuos, entre los cuales hay un triptofano (Trp55), una tirosina (Tyr56), cinco residuos de fenilalanina (Phe8, 14, 42, 87 y 101) y ninguna cisteína (Figura 7). En la secuencia de YLSCP2 se pueden encontrar sitios de N- acetilación y un sitio formado por tres residuos del extremo C-terminal ('NNL') compatible con la señal de direccionamiento a peroxisomas tipo-1 (PST1). Los sitios de N-acetilación son comunes en la mayoría de las SCP2 de hongos [118] y la señal PST1 se encuentra en todas las secuencias aminoacídicas de las SCP2 [119].

La similitud entre YLSCP2 y otros miembros de la familia SCP2 fue analizada mediante un alineamiento de secuencias. La búsqueda bioinformática de secuencias

SCP2 (BLAST 2.0, *Basic Local Alignment Search Tool*, NCBI, EE.UU.) arroja más de 100 proteínas con dominios SCP2, que pertenecen a especies de los reinos eucariota, bacteria y arquea. El alineamiento de 34 secuencias representativas de las SCP2 (datos no presentados) muestra la mayor similitud entre la secuencia de YLSCP2 y las de *Neurospora crassa*, *Aspergillus fumigatus*, *Botryotinia fuckeliana*, y *Aspergillus nidulans* (Tabla III). Además, YLSCP2 presenta una alta identidad de secuencia con las SCP2 de otros hongos, de eucariotas multicelulares y de arqueas y bacterias (Tabla III).

Tabla III. Identidad de secuencia de aminoácidos entre YLSCP2 y las SCP2 de otros organismos.

Organismos	Identidad de secuencia (%)
<i>Neurospora crassa</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Botryotinia fuckeliana</i> , y <i>Aspergillus nidulans</i>	53-57
Otros hongos	38-52
Eucariotas multicelulares	20-28
Bacterias y Arqueas	17-29

El alineamiento de secuencias aminoacídicas representativas de las SCP2 de los tres reinos biológicos, incluyendo a YLSCP2, muestra la presencia de residuos altamente conservados (Figura 23). La mayoría de estos residuos se ubican cerca del extremo C-terminal de las proteínas y algunos de ellos están implicados en la unión de ligandos (Figura 23, sombreado gris y puntos). Estos resultados demuestran que la secuencia aminoacídica de los miembros de la familia de las SCP2 se encuentra altamente conservada, sugiriendo que la evolución de estas proteínas está restringida por requerimientos estructurales y/o funcionales.

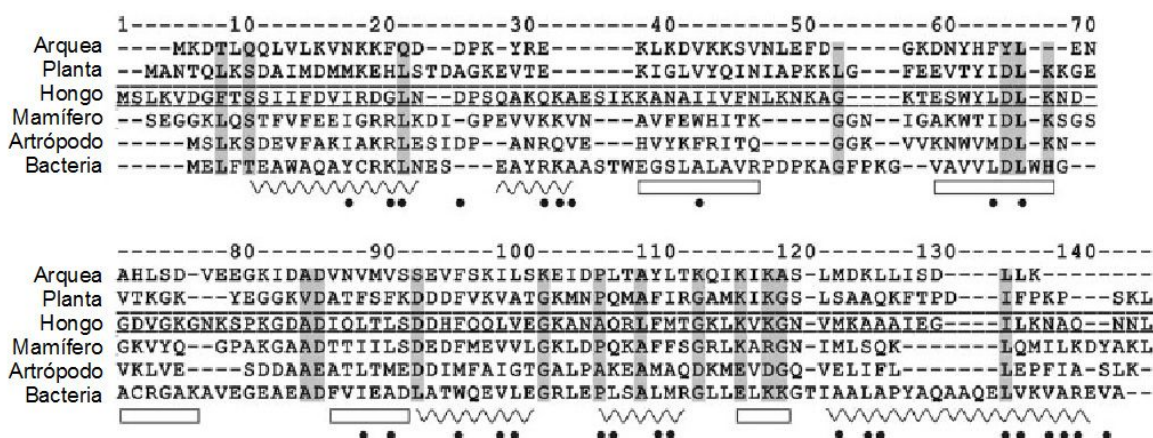


Figura 23. Alineamiento de secuencias aminoacídicas representativas de las SCP2 de los tres reinos biológicos. Las secuencias SCP2 pertenecen a *T. volcanium* (Arquea), *T. thermophilus* HB27 (Bacteria), *A. thaliana* (Planta), *Y. lipolytica* (Hongo), *H. sapiens* (Mamífero) y *A. aegypti* (Artrópodo). La secuencia de YLSCP2 está resaltada con líneas horizontales. Las estructuras α -hélice (líneas ondeadas) y hoja- β (rectángulos) corresponden a las observadas en las estructuras SCP2 reportadas. Las posiciones sombreadas corresponden a los residuos altamente conservados. Los puntos indican los residuos

involucrados en la unión de ácido palmítico y Tritón X-100 en las estructuras reportadas para SCP2 de *A. aegypti* (1PZ4) y *H. sapiens* (1IKT).

2.VI.b. Análisis de las estructuras SCP2 reportadas

Las características estructurales de las SCP2 fueron estudiadas mediante un alineamiento estructural de miembros pertenecientes a los tres dominios biológicos (bacteria [86], insecto [90] y mamífero [89]). La superposición de las estructuras muestra la alta similitud estructural de los miembros de esta familia de proteínas (Figura 24). El desplazamiento cuadrático medio (RMSD) de los residuos equivalentes en la estructura refleja la diferencia entre la posición de residuos de dos estructuras proteicas. El valor obtenido de RMSD entre SCP2 humana y de insecto (1.15 Å) y entre SCP2 de insecto y de bacteria (1.4 Å) es mucho menor que el obtenido con lisozima (> 2 Å), una proteína de tamaño similar que no presenta homología con las SCP2. Los residuos implicados en la unión de ligandos se ubican en posiciones similares en el alineamiento estructural y presentan propiedades de cadena lateral preservadas en cada posición. Este alineamiento estructural presentado provee una visión unificada de la estructura tridimensional de la familia SCP2 y podría ser clave para el modelado de la relación entre secuencia-estructura-función (Figura 24).

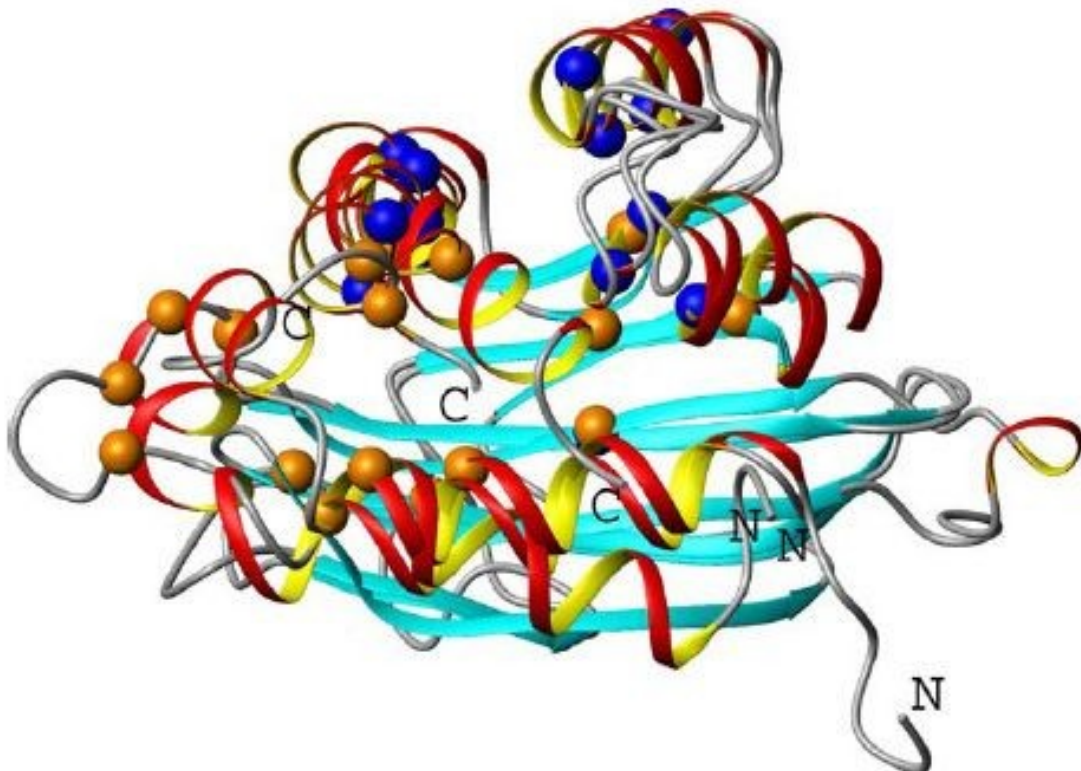


Figura 24. Alineamiento estructural de SCP2. Los dominios SCP2 de bacteria (2CXT),

artrópodo (1PZ4) y mamífero (1IKT) fueron superpuestos minimizando el RMSD de elementos comunes de la estructura secundaria. Se indican los extremos N y C-terminal (N y C) y los residuos involucrados en la unión de lípidos (esferas azules: 1IKT, [89] y naranjas: 1PZ4, [90]).

Un detalle interesante de este alineamiento es que la hélice C-terminal en SCP2 de bacteria es más larga que en SCP2 de mamíferos y artrópodos y parece obstruir parcialmente la cavidad de unión (Figura 24). Por otro lado, la hélice C-terminal está pobremente definida en la estructura obtenida por RMN de SCP2 de *Thermus thermophilus* HB8 y en el modelo de NMR de SCP2 de conejo, sugiriendo una alta movilidad [87][83]. Estas observaciones sugieren que la flexibilidad de la hélice C-terminal podría modular el acceso de los ligandos a la cavidad de unión [86].

2.VI.c. Estructura modelo de YLSCP2

La estructura modelo para YLSCP2 fue obtenida por homología (JIGSAW 2.0), utilizando la estructura de SCP2 de conejo (1IC44) como molde [120]. El modelo generado automáticamente fue mejorado por análisis visual, minimización de la energía local en regiones con conflictos estéricos y selección de rotámeros alternativos de las cadenas laterales dónde se observaron problemas de empaquetado.

La estructura modelo obtenida para YLSCP2 presenta un alto grado de conservación del patrón hidrofóbico de los elementos de estructura secundaria. El alineamiento de los átomos equivalentes de la cadena principal de YLSCP2, cSCP2 (1C44, [86]), AeSCP2 (1PZ4, [90]), y mfe2hSCP2 (1IKT, [89]) arroja un RMSD de 0.53 Å (Figura 25). Este valor de RMSD aumenta (1.03 Å) al incluir la estructura de la SCP2 de *Thermus thermophilus* (2CX7; [92]) en la superposición, pero sigue siendo menor que el RMSD entre la estructura de YLSCP2 y lisozima, una proteína no homóloga de tamaño similar (> 2 Å). Estos resultados indican que el modelo estructural de YLSCP2 está de acuerdo con la estructura molde y con otras estructuras reportadas de SCP2.

La estructura de YLSCP2 presenta el plegado típico de las SCP2, caracterizado por una hoja-β compuesta de cinco hebras la cual está cubierta por una capa de cuatro α-hélices (Figura 25). La región central de la estructura contiene una amplia cavidad delimitada por residuos hidrofóbicos que forman el sitio de unión de lípidos. Esta cavidad de unión está formada por 12-15 cadenas laterales altamente conservadas entre las diferentes especies, desde bacterias hasta humanos (Figura 23). La superficie expuesta al solvente (ASA) de YLSCP2 está compuesta en un 60 % (6,052 Å²) por residuos hidrofóbicos, entre los cuales aproximadamente un 26 % corresponde a residuos de la cavidad de unión putativa.

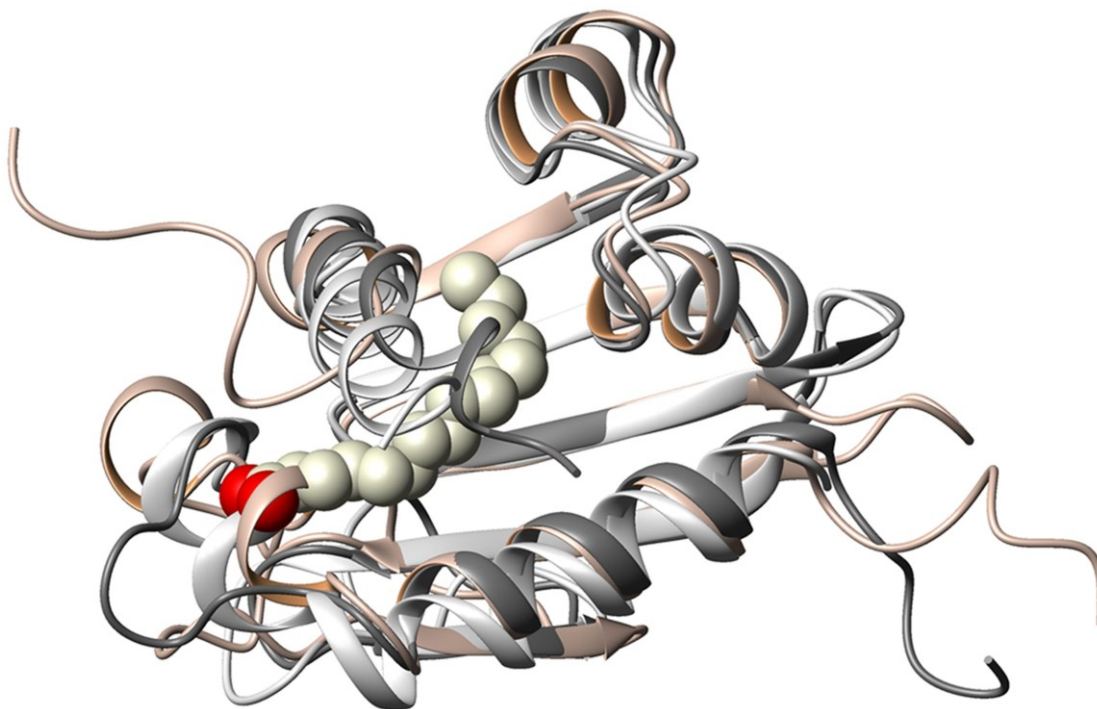


Figura 25. Alineamiento entre YLSCP2 (rosa), mfe2SCP2 humana (gris claro, 1IKT) y AeSCP2 (gris oscuro, 1PZ4), mostrando la molécula de ácido palmítico unida a AeSCP2 (esferas rojas y amarillo claro).

Hasta dos moléculas de ácido palmítico han sido observadas en el sitio de unión de las variantes de SCP2 de insecto [94]. El Triton X-100 unido a mfe2hSCP2 se ubica en la misma orientación que se une una de las moléculas de ácido palmítico en SCP2-L2 de insecto [89]. Dada su importancia fisiológica, fue analizado el posicionamiento de ligandos en el sitio de unión de YLSCP2 de acuerdo al alineamiento estructural (Figura 26). Los ligandos encajan satisfactoriamente en el modelo de YLSCP2, asumiendo que se unen en la misma orientación que en SCP2 de insecto y humana. En una de las posiciones el grupo carboxilato del ácido graso choca con una de las hélices de YLSCP2, lo cual fue observado también en la comparación de apo y holo-SCP2 [89]. Resumiendo, la estructura obtenida para YLSCP2 presenta una cavidad con una gran superficie hidrofóbica disponible, consistente con el rol propuesto para YLSCP2 como una proteína de almacenamiento y transporte de lípidos no- específica [33]. Además, la superficie de YLSCP2 presenta una zona altamente cargada formada por una serie de residuos básicos agrupados en un corto segmento de secuencia (Arg98, Lys104, Lys106, Lys108 y Lys113).

Este potencial positivo podría estar implicado en la unión de ligandos y/o en la interacción con membranas (Figura 27).

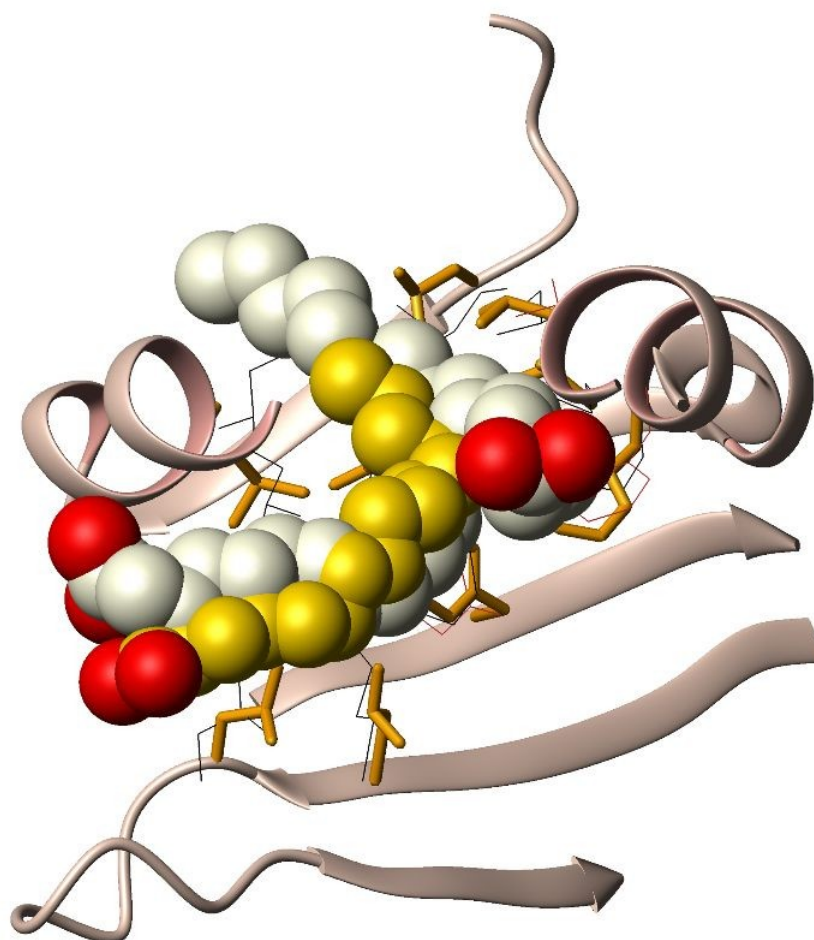


Figura 26. Sitio de unión de ligandos de la estructura modelo de YLSCP2. Las moléculas de ácido palmítico se representan en las orientaciones descritas en AeSCP2 (amarillo, 1PZ4) y AeSCP2-L2 (blanco, 2QZT). Las cadenas laterales que están en contacto con el ligando se muestran según el alineamiento de la Figura 24, para YLSCP2 (líneas gruesas amarillas), AeSCP2 (líneas negras) y mfe2SCP2 (líneas marrones).

La evidencia biofísica experimental demuestra que YLSCP2 forma un dímero a altas concentraciones de proteína, por lo que fue realizado un modelo para la estructura dimérica de YLSCP2 según la estructura de rayos-X reportada recientemente para AeSCP2-L2 (3BDQ, [94]). El modelo del dímero para YLSCP2 presenta una superficie de contacto de aproximadamente 652 Å², que representa un ~ 10 % del total de la superficie expuesta del monómero (Figura 27). Los residuos que forman la interface de dimerización son Asn95, Ala96, Gln97, Phe100, Met101, Leu105, Lys106, Val107, Lys108, Gly109, Asn110, Val111, Met112, Ala114, Ala115, Glu118, Gly119 y Leu121. La superficie de esta interface está compuesta por un 59 % de residuos hidrofóbicos y un 23 % de residuos

polares. La naturaleza y composición de la superficie de dimerización es similar a la determinada para AeSCP2-L2 [94].

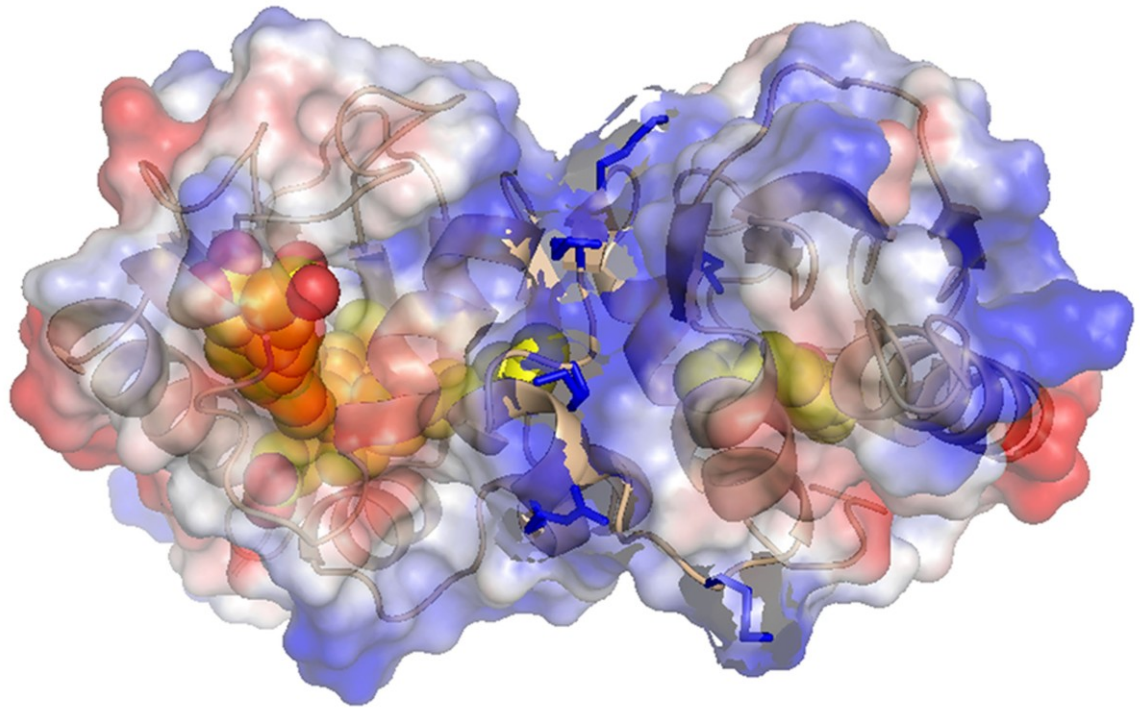


Figura 27. Estructura del dímero de YLSCP2, mostrando el potencial electrostático superficial. La estructura de YLSCP2 y los ligandos reportados en AeSCP2 (1PZ4) y AeSCP2-L2 (2QZT) son visibles a través de la superficie semitransparente. Las cadenas laterales de los residuos cargados positivamente que se suponen importantes para la unión de ligandos y la interacción con membranas están representados como líneas azules.

3. Discusión

El objetivo principal de esta tesis es la caracterización biofísica y bioquímica de YLSCP2. Para lograr esto fue desarrollado un sistema de expresión recombinante de YLSCP2 en *E. coli*, que permite producir grandes cantidades de proteína. La expresión recombinante de otros miembros de las SCP2 ha sido reportada previamente [121][122][58][71] y fue demostrado que la expresión de SCP2 en forma soluble altera el perfil de lípidos de la bacteria hospedadora [123]. En el caso de YLSCP2 la proteína se localiza en cuerpos de inclusión, donde se encuentra prácticamente pura, desnaturalizada y sin lípidos unidos. De esta forma se evitan modificaciones en el metabolismo de lípidos de *E. coli* y la proteína obtenida no posee ligandos unidos que puedan interferir en la caracterización biofísica.

La estructura secundaria de YLSCP2 es del tipo $\alpha + \beta$ y el espectro de CD en el UV-lejano es muy parecido al espectro reportado para hSCP2 [124]. La estructura terciaria de YLSCP2 es altamente organizada y el triptofano se encuentra oculto al solvente de acuerdo a los espectros de CD en el UV-cercano y de fluorescencia y al ensayo de atenuación de fluorescencia. Cuando la concentración de proteína es baja YLSCP2 se encuentra como monómero y a concentraciones mayores de $\sim 100 \mu\text{M}$ forma dímero según los ensayos de FPLC, entrecruzamiento, SAXS y anisotropía de fluorescencia. Esto sugiere que la forma dimérica de YLSCP2 podría tener relevancia biológica *in-vivo*, ya que la concentración de YLSCP2 en los peroxisomas de *Y. lipolytica* se puede estimar en $\sim 30 \mu\text{M}$ [125].

El análisis bioinformático de las secuencias aminoacídicas y de las estructuras resueltas de SCP2 indica que tanto la estructura tridimensional como los residuos implicados en la unión de sustratos hidrofóbicos están altamente conservados. En base a esto, fue realizado un modelo teórico de la estructura de YLSCP2, a partir del cual fue simulada una estructura putativa del dímero de YLSCP2 en base a la estructura dimérica presentada para AeSCP2-L2 [94].

Al menos dos regiones de la estructura teórica de YLSCP2 son de considerable interés. En trabajos previos se sugiere que la región N-terminal (Thr8-Ala38), puede estar involucrada en la interacción con membranas, la captura y liberación de ligandos y/o la estabilización de los ligandos unidos [126][124]. Esta región incluye los residuos que interaccionan y estabilizan el grupo carboxilato del ácido graso en la estructura de rayos-X de AeSCP2 [90]. A partir de las estructuras reportadas se supone que esta región puede constituir un portal de ingreso para los ácidos grasos permitiendo la unión. Además, es probable que la unión del ligando desarme la conformación helicoidal observada en cSCP2 y hSCP2, generando el *loop* observado en la estructura de SCP2 de mosquito con ligando

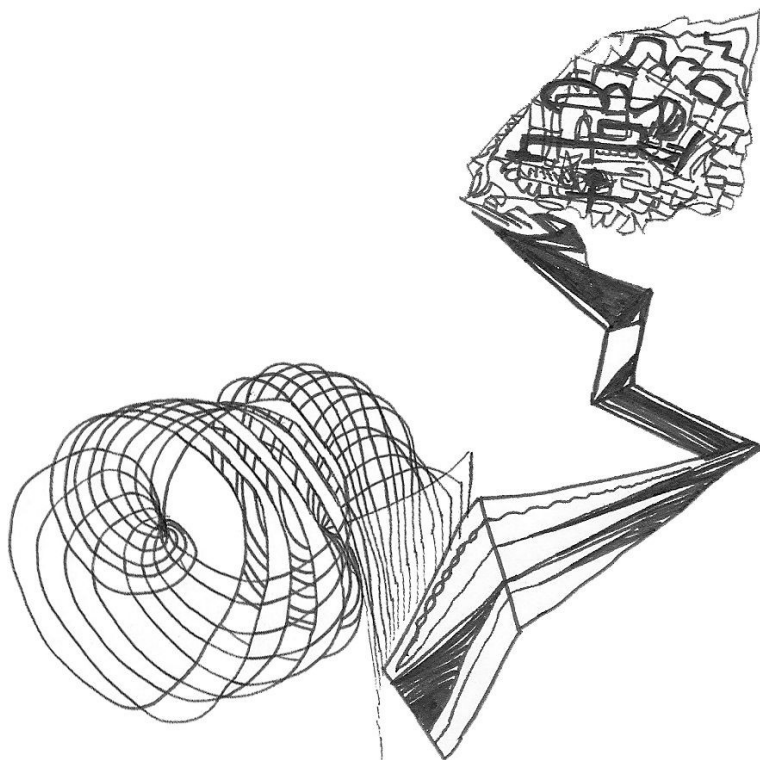
unido [90]. Este cambio conformacional debería ocurrir también en YLSCP2 ya que la estructura teórica obtenida presenta la zona mencionada en conformación helicoidal.

La segunda región de interés está caracterizada por una superficie con un potencial positivo alto que se encuentra adyacente a la zona de homo-dimerización (Figura 27). Se pueden encontrar parches positivamente cargados similares (aunque de naturaleza deslocalizada) en las estructuras de mfe2SCP2 humana y en las dos SCP2 de insecto. Esto sugiere un posible mecanismo por el cual las interacciones electrostáticas podrían estabilizar la cabeza polar del ácido graso unido a YLSCP2 y/o acercar la región portal y la membrana promoviendo el intercambio de ligandos.

En resumen, fue diseñado un protocolo para producir YLSCP2 en grandes cantidades y fue determinado que la misma se encuentra plegada en la estructura esperada. Además se obtuvo un modelo estructural de YLSCP2 adecuado para la interpretación de los resultados experimentales. Estos resultados nos permiten continuar con la caracterización termodinámica y funcional de YLSCP2.

Capítulo III

CARACTERIZACIÓN TERMODINÁMICA DE YLSCP2



1. Introducción

1.1. La estabilidad de las proteínas

1.1.a. El compromiso termodinámico del estado plegado

La estructura nativa de las proteínas está formada por una suma de interacciones (Tabla I). Estas interacciones pueden ser covalentes o no covalentes, internas (entre átomos de la proteína) o externas (entre la proteína y el medio), etc. Cada una de estas interacciones pueden estabilizar o desestabilizar la estructura final, pero generalmente la suma de todas las interacciones favorece a la estructura plegada en condiciones fisiológicas, con una estabilidad marginal en relación al estado desplegado [127].

Tabla I. Interacciones químicas que estabilizan a las proteínas.

Resumen de los tipos de enlaces químicos típicos de proteínas, indicando la dependencia con la distancia y el aporte de energía libre promedio (entalpía de enlace) [128].

Interacción	Ejemplo	Dependencia con la distancia (r)	Distancias típicas (Å)	Energía libre (kJ/mol)
Enlace covalente	$-\text{C}_\alpha-\text{C}-$	-	1.5	356
Puente disulfuro	$-\text{Cys}-\text{S}-\text{S}-\text{Cys}-$	-	2.2	167
Puente salino	$-\text{COO}^- \cdots \cdots \text{H}_3\text{N}^+$	< 3.5	2.8	12.5-17
Puente de hidrógeno	$-\text{NH} \cdots \cdots \text{OC}-$	< 3.5	3.0	2-6 en agua 12.5-21 si alguno de los grupos está cargado
Interacción electrostática de amplio rango	$-\text{COO}^- \quad \quad \quad \text{H}_3\text{N}^+$	$1/r_i$	variable	Depende de la distancia y el medio.
Van der Waals	$-\text{CH}_3 \quad \quad \quad \text{HC}-$	$1/r^6$	3.5	4-17

La contribución de estas interacciones a la estabilidad de las proteínas se cuantifica en términos de la energía asociada con cada una de ellas, la que se puede relacionar con la entalpía de enlace (calor liberado cuando se forma o se rompe un enlace). Sin embargo, la entalpía de enlace no ofrece un panorama completo de la energética de las interacciones en sistemas biológicos porque no considera la contribución del agua.

El agua juega dos roles importantes en la modulación de la fuerza de las interacciones débiles. El primero está relacionado con la capacidad de interacción del agua con los grupos polares de las proteínas. Por ejemplo, la interacción del agua con grupos dadores y receptores de hidrógeno tiene una entalpía equivalente a la entalpía de la interacción de esos grupos entre sí. De esta forma la entalpía neta de la formación de un enlace nativo toma valores pequeños.

El segundo rol se debe a la contribución del agua en la entropía de las interacciones débiles. Un ejemplo de la importancia de la contribución entrópica del agua se observa en

el efecto hidrofóbico. Los grupos no polares son rodeados por un grupo de moléculas de agua que presentan mayor orden que las moléculas en el seno del líquido. Cuando varios de estos grupos se fusionan liberan estas moléculas de agua organizadas aumentando la entropía. Este aumento de entropía que resulta de la asociación de grupos hidrofóbicos es la fuerza que dirige el efecto hidrofóbico.

La estabilidad de las proteínas es consecuencia de una combinación de efectos entálpicos y entrópicos. La mayoría de las interacciones débiles liberan 4 - 13 kJ/mol de energía libre y se pueden encontrar en gran número en una proteína. Aunque cientos de puentes de hidrógeno e interacciones de van der Waals se forman en una proteína plegada, la energía libre de estabilización neta (diferencia de energía entre los estados plegado y desplegado) es pequeña (20 - 42 kJ/mol) [128]. Esto se debe a que la energía liberada cuando se forman las interacciones nativas es muy similar a la enorme pérdida de flexibilidad conformacional (disminución de entropía) que ocurre cuando la proteína se pliega en una estructura nativa ordenada y compacta (Figura 1).

1.1.b. La flexibilidad del estado plegado

Los enlaces químicos presentan flexibilidad a temperaturas mayores al cero absoluto, los átomos vibran, los grupos químicos rotan, etc. A temperaturas fisiológicas hay suficiente energía térmica para que las interacciones no covalentes se rompan y formen frecuentemente. El estado nativo de las proteínas se estabiliza por fuerzas no covalentes. Las fluctuaciones conformacionales de las proteínas son suficientemente grandes como para permitir el ingreso de moléculas de agua al interior de la proteína. Estas fluctuaciones son esenciales para que las proteínas cumplan funciones como la unión de ligandos o la catálisis enzimática.

Cuando una interacción se rompe, los grupos liberados pueden formar un nuevo enlace de energía comparable. Esto puede ocurrir en una escala de tiempo más rápida que el tiempo necesario para determinar la estructura por técnicas como cristalografía de rayos-X. Por esto, las estructuras tridimensionales de proteínas determinadas mediante técnicas físicas son una imagen estática de la estructura prevalente. Los movimientos de las proteínas pueden ser clasificados según su relación con la estructura promedio. Los movimientos más rápidos son las fluctuaciones atómicas como las vibraciones interatómicas y las rotaciones de los grupos metilo. En una escala de tiempo mayor se encuentran los movimientos colectivos de grupos de átomos unidos de forma covalente y átomos vecinos no unidos de forma covalente. Los movimientos más lentos son de larga escala temporal (y espacial) tal como los cambios conformacionales inducidos por ligandos.

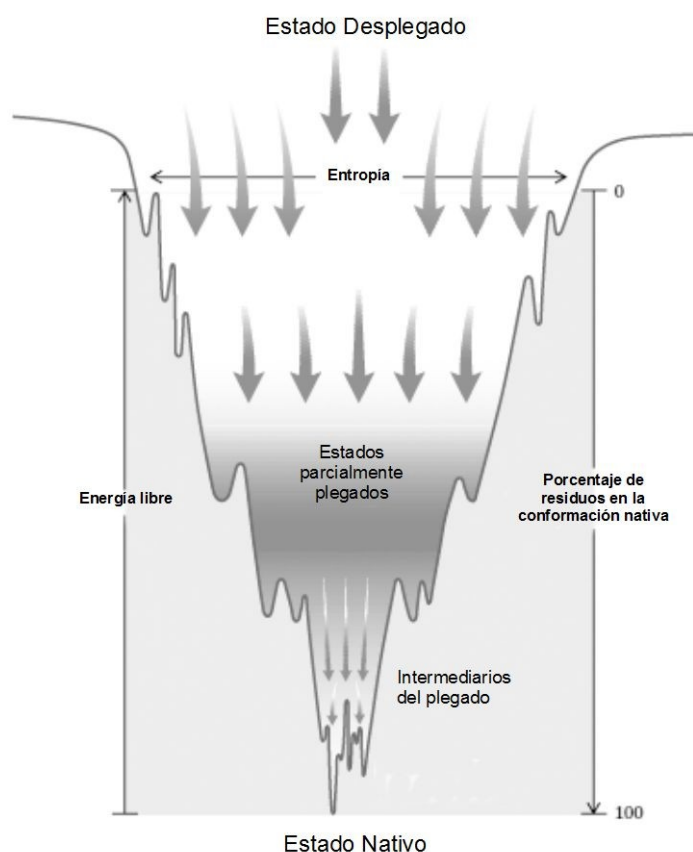


Figura 1. Esquema del proceso de plegado de las proteínas representado por un 'embudo conformacional'. A medida que la conformación proteica se acerca al estado nativo (el fondo del embudo), la energía libre y la entropía disminuyen, y el porcentaje de residuos en la conformación nativa aumenta. Los valles cercanos al estado nativo representan intermediarios del plegado [129].

1.1.c. Desplegado de proteínas

Las proteínas han evolucionado para funcionar en condiciones específicas. Pequeños cambios en las condiciones del medio pueden generar cambios estructurales que afecten su función. Las interacciones débiles que estabilizan la forma nativa de una proteína se rompen a altas temperaturas generando una estructura desplegada o desnaturalizada en la que las interacciones nativas son reemplazadas por interacciones con moléculas de agua. Si la temperatura aumenta lentamente, la conformación de las proteínas se mantiene casi intacta hasta que se produce una pérdida de estructura abrupta en un rango de temperatura pequeño.

Esto sugiere que el desplegado es un proceso cooperativo donde la pérdida de estructura en una parte de la proteína desestabiliza la estructura global.

Las proteínas también pueden desplegarse mediante el agregado de desnaturalizantes químicos (urea, cloruro de guanidinio), solventes (etanol, acetona), detergentes (SDS) o cambios de pH. La principal forma de acción de algunos de estos

desnaturalizantes es la ruptura de las interacciones hidrofóbicas que mantienen la estabilidad del núcleo proteico. Por ejemplo, los cambios de pH alteran la carga neta de las proteínas generando repulsiones electrostáticas y la ruptura de algunos puentes de hidrógeno. Cabe destacar que los estados desplegados obtenidos con diferentes tratamientos no son necesariamente estructuralmente equivalentes.

1.II. La estabilidad de las SCP2

1.II.a. Desnaturalización inducida por temperatura

La estabilidad térmica de SCP2 fue determinada por primera vez siguiendo la pérdida de actividad inducida por temperatura [130]. La actividad de SCP2 de hígado de rata (rSCP2) como activador de la conversión microsomal de 7-dehidrocolesterol a colesterol se pierde a partir de 65 °C [130].

Más adelante, fue determinada la estabilidad térmica de SCP2 humana (hSCP2) siguiendo la señal de dicroísmo circular (CD) en el UV-lejano [131]. El desplegado de hSCP2 inducido por temperatura fue descrito con un modelo de dos estados, a partir del cual se obtuvo una temperatura media de desplegado (T_m) de 70.5 ± 0.5 °C y un cambio de entalpía asociado (ΔH) de 183 ± 10 kJ mol⁻¹. Tanto T_m como ΔH son idénticas para concentraciones de proteínas que difieren por un factor de ~ 40 , indicando que no se forman ni se disocian oligómeros durante el proceso de desplegado. Este resultado fue el primero reportado para el desplegado inducido por temperatura para un miembro de las SCP2 [131], y no se han publicado más ensayos de este tipo para otras SCP2.

1.II.b. Desnaturalización inducida por agentes caotrópicos

El desplegado de hSCP2 fue estudiado mediante el agregado de cloruro de guanidinio (GuHCl) [131]. La transición, detectada mediante CD en el UV-lejano, está centrada a 0.82 M GuHCl y presenta una energía libre estándar (ΔG^0_D) de 15.5 kJ mol⁻¹. La estabilidad relativa de hSCP2 y pre-hSCP2 al desplegado inducido con GuHCl fue determinada siguiendo la señal de CD en el UV-lejano [132]. La concentración de GuHCl requerida para lograr un

50 % de desplegado fue de 0.80 M para hSCP2 y 0.82 M para pre-hSCP2. Los cambios de energía libre en ausencia de desnaturalizante fueron 14.7 y 14.9 kJ/mol, respectivamente, indicando que no hay diferencias en la estabilidad de pre-hSCP2 y hSCP2. Nuevamente, sólo se han reportado datos para el desplegado inducido por caótropos para hSCP2, no se han publicado datos sobre la estabilidad de otros miembros de las SCP2. Además, el proceso de desplegado fue estudiado siguiendo una única

sonda, por lo que es posible que en realidad existan más transiciones que las reportadas.

1.II.c. Efecto del pH y el etanol sobre la estabilidad de las SCP2

El efecto del pH sobre las SCP2 fue estudiado en numerosos trabajos, pero ninguno de ellos realiza un estudio exhaustivo sobre la estabilidad de SCP2 en función del pH. Este aspecto, aunque poco explorado, es de crucial importancia debido a varios factores. Por ejemplo, la transferencia de ligandos entre membranas mediada por SCP2 es inhibida a pH ácido [133]. Por otro lado, la unión de ácido oleico a hSCP2 seguida por RMN muestra un comportamiento dependiente del pH, con una disociación del ligando cuando el pH es menor a 7 [97]. Esto sugiere una alta accesibilidad al solvente del grupo carboxilato del ácido graso. Para descartar la posibilidad de que hSCP2 este sufriendo un cambio conformacional inducido por el pH que sea responsable de la disociación del ligando, se realizaron espectros de dicroísmo circular (CD) en el UV-lejano en función del pH (4.5 - 7.4). Los espectros de CD muestran un aumento de la intensidad del pico a 208 nm cuando disminuye el pH de 7.4 a 5.5, pero a pH 4.5 la forma del espectro es similar a la del espectro a pH 7.4. Por otro lado, el estudio del decaimiento de la fluorescencia y de la anisotropía de hSCP2 a diferentes valores de pH (4.5 - 7.4) demuestra que el tiempo de vida de la fluorescencia del triptofano, la anisotropía de fluorescencia residual y el radio hidrodinámico de hSCP2 no se afectan significativamente. Finalmente, los estudios de RMN en función del pH indican que los desplazamientos químicos de hSCP2 (carbono- ϵ de residuos de lisina y carbonos aromáticos de residuos de fenilalanina) no presentan cambios con el pH (5.0 - 7.4). En conjunto, estos resultados indican que el cambio del pH no produce cambios significativos en la estructura global de hSCP2 [97].

Está reportado que la actividad de hSCP2 disminuye con el agregado de etanol, pero no se han presentado estudios del efecto del etanol sobre la estructura o la estabilidad de la proteína. El efecto del etanol sobre la actividad de unión de ligandos de hSCP2 fue analizado en comparación con la proteína de unión de ácidos grasos de hígado de rata L-FABP [134]. La unión de NBD-esteárico a L-FABP no se ve afectada por el agregado de etanol, mientras que este solvente inhibe la unión de NBD-esteárico a hSCP2. La afinidad de unión de NBD-colesterol y NBD-fosfatidilcolina a hSCP2 también disminuye con el agregado etanol, aunque este efecto se observa con concentraciones de etanol menores que las observadas para la unión de NBD-esteárico [135]. Estos resultados indican que el etanol afecta la unión de los ligandos a hSCP2 de forma diferencial. Además, el etanol induce cambios en la expresión de SCP2 de hígado y de cerebro *in-vivo*. Estas SCP2 (hígado y cerebro) difieren en un aminoácido, un cambio conservativo de alanina por valina en la posición 55. La expresión de SCP2 en el hígado no se modifica con el

consumo de alcohol, mientras que en tejido cerebral de ratones tratados de forma crónica con etanol la expresión se incrementa un 56 % . Esto plantea la posibilidad de que el efecto del etanol sobre la actividad de las SCP2 podría tener relevancia biológica.

La actividad de las SCP2, como la de todas las enzimas, depende de las condiciones del medio tanto por las características propias de la proteína, como por el efecto de estas condiciones en los ligandos. Para comprender el mecanismo de unión de ligandos a las SCP2 es indispensable conocer en detalle la estabilidad de estas proteínas en función del pH, la fuerza iónica y el agregado de solventes.

1.II.d. Plasticidad conformacional

A partir de las estructuras tridimensionales resueltas para los complejos de las SCP2 con ligandos es evidente la plasticidad conformacional de estas proteínas, la que parece ser relevante para la unión de ligandos. Los estudios de RMN de hSCP2 indican una flexibilidad conformacional alta, determinada mediante la dependencia de los desplazamientos químicos de los grupos amida con la temperatura [85]. En las regiones rígidas de la proteína, los movimientos al azar se elevan con la temperatura, presentando cambios lineales de los desplazamientos químicos. En las regiones involucradas en un intercambio entre conformaciones alternativas los desplazamientos químicos exhiben una dependencia curva de con la temperatura [136]. En hSCP2 se observan desplazamientos químicos con dependencia significativamente curvada en las amidas 41 - 126 de la cadena principal, incluyendo todas las hélices- α . Los residuos afectados están localizados en los alrededores de la cavidad de unión de lípidos. Además, los resultados de relajación de RMN proveen evidencia directa de la presencia de flexibilidad conformacional (escalas de tiempos de ps-ns) y los experimentos de CPMG/HSQC indican la presencia de una dinámica a bajas escalas de tiempo (μ s-ms). Estos experimentos de relajación de RMN muestran que las hélices III-V están altamente involucradas en estos procesos dinámicos.

1.III. Objetivos para la caracterización termodinámica de YLSCP2

La estabilidad de las proteínas está fuertemente relacionada con su estructura y función. Las SCP2 pueden unir un amplio rango de compuestos hidrofóbicos, los cuales poseen diferentes propiedades estructurales y fisicoquímicas. Esto sugiere que estas proteínas presentan una plasticidad conformacional que permite la unión de este amplio espectro de ligandos. La actividad de las SCP2 se ve alterada por cambios en el pH y por el agregado de etanol, lo que podría tener relevancia biológica. Sólo se han publicado ensayos del desplegado inducido por temperatura o por caótropos de SCP2 de

mamíferos, por lo que no existe información termodinámica sobre las SCP2 de otros organismos. Además, los trabajos publicados no analizan en profundidad la estabilidad de las SCP2 en función del pH, solventes y fuerza iónica. Este tipo de estudios es indispensable para determinar posteriormente el efecto de la unión de ligandos sobre la estabilidad de las SCP2 y para comprender las posibles funciones in- vivo de esta familia de proteínas.

En el capítulo I de esta tesis fue descripta la determinación del contenido de estructura secundaria y terciaria de YLSCP2, así como también su estado de agregación. En base esos resultados, en este capítulo se analizará la estabilidad de YLSCP2, así como también el efecto del pH, la fuerza iónica y el agregado de solventes sobre la estructura de esta proteína.

2. Resultados

2.1. *Estabilidad estructural de YLSCP2*

La estructura de YLSCP2 está formada por una hoja- β y un manojo de hélices- α , entre las cuales se forma la cavidad hidrofóbica donde se ubica el sitio de unión de ligandos. Además, esta proteína tiene un $pI > 8.0$ y presenta un potencial electrostático positivo cerca del extremo C-terminal. Los cambios en las condiciones de pH, fuerza iónica y/o constante dieléctrica del medio podrían modificar el contenido de carga superficial neta y el grado de exposición de la cavidad hidrofóbica de unión de ligandos. A continuación son presentados los resultados del efecto del pH, la fuerza iónica y algunos solventes (etanol y DMSO) sobre la estructura secundaria y terciaria de YLSCP2.

2.1.a. *Efecto del pH*

El contenido de estructura secundaria y terciaria de YLSCP2 en función del pH fue analizado mediante dicroísmo circular (CD). Los espectros de CD en el UV-lejano muestran que la elipticidad molar de YLSCP2 es menor a pH 4.0 que a pH 7.0 - 9.0 (Figura 2). La pérdida de estructura secundaria a pH 4.0 podría deberse a interacciones repulsivas de carga ya que YLSCP2 tiene un pI básico. A pH 9.0, se observa un ligero incremento del contenido α -helicoidal respecto a pH 7.0. Estos resultados indican que existe un efecto del pH sobre la estructura secundaria de la proteína en el rango de 4 - 9.

Por otro lado, los espectros de CD en el UV-cercano en función del pH muestran que la elipticidad molar no presenta cambios importantes en el rango de pH 7.0 - 9.0. Por el contrario, a pH 5.0 la señal dicroica es menor, en concordancia con lo observado en los espectros de CD en el UV-lejano (Figura 2).

En resumen, YLSCP2 presenta mayor contenido de estructura secundaria y terciaria a pH básico, mientras que cuando el pH es menor a 5 la proteína comienza a desnaturalizarse. Esto podría tener relevancia biológica ya que el pH de los peroxisomas es diferente al pH del citoplasma, siendo en algunos casos más básico [137][138][139] y en otros más ácido [140] [141]. Además, este resultado sugiere que la pérdida de estructura podría ser la causa de la disminución de la actividad a pH ácido reportada para otras SCP2 [97].

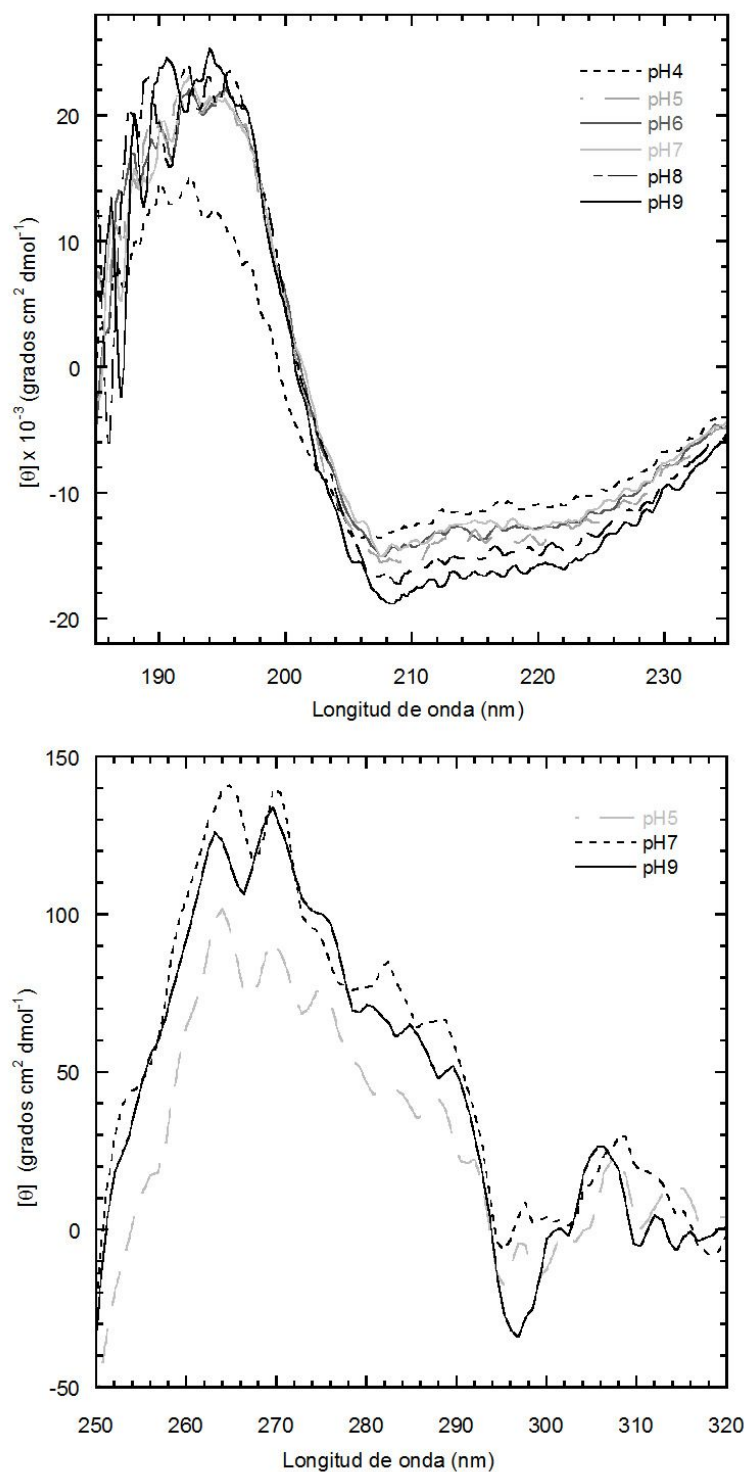


Figura 2. Espectros de dicroísmo circular de YLSCP2 en función del pH en el UV-lejano (A) y en el UV-cercano (B). El pH al que corresponde cada curva está indicado en los gráficos.

2.1.b. Efecto de la fuerza iónica

La cavidad hidrofóbica de YLSCP2 está parcialmente expuesta al solvente. Los cambios en la fuerza iónica del medio podrían afectar la estructura de la proteína al

modificar la solubilidad de los residuos hidrofóbicos que componen el sitio de unión. Hasta el momento no se han publicado trabajos que estudien el efecto de la concentración de sales sobre la estructura, estabilidad y función de las SCP2.

El efecto de la fuerza iónica sobre la estructura terciaria de YLSCP2 fue analizado mediante fluorescencia de triptofano en función de la concentración de cloruro de sodio. Los espectros de emisión de fluorescencia de triptofano no muestran cambios significativos con el aumento de la concentración de cloruro de sodio. La intensidad de fluorescencia a 326 nm parece aumentar levemente, pero el ajuste lineal ($R^2 = 0.085$) demuestra que no existe una correlación (Figura 3). Este resultado demuestra que la estructura terciaria alrededor del triptofano de YLSCP2 no cambia significativamente con el agregado de sales.

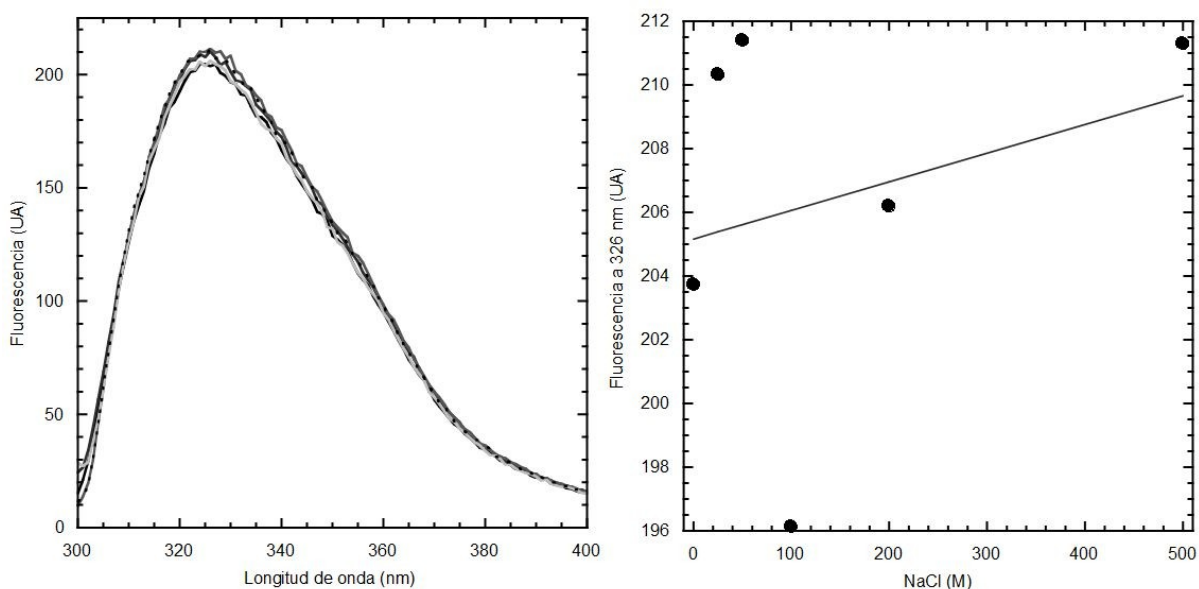


Figura 3. Espectros de fluorescencia de YLSCP2 en función de la concentración de cloruro de sodio luego de una excitación a una longitud de onda de 290 nm (panel izquierdo). En el panel derecho se muestra la intensidad de fluorescencia a 326 nm (círculos negros) en función de la concentración de cloruro de sodio (NaCl) y el correspondiente ajuste lineal (línea), el cual tiene un coeficiente de correlación de 0.085.

2.1.c. Efecto de los solventes orgánicos en YLSCP2

Los ligandos de YLSCP2 son compuestos hidrofóbicos que presentan muy baja solubilidad en agua. Por esto, en los ensayos de unión de lípidos a proteínas usualmente es necesario disolver estos sustratos en solventes orgánicos. Sin embargo, los solventes orgánicos pueden afectar la estabilidad de las proteínas, afectando como consecuencia la actividad biológica. Este es el caso del etanol, el cual disminuye la actividad de las SCP2 [134][135]. Para seleccionar un solvente adecuado para la disolución de ligandos hidrofóbicos fue analizado el efecto del etanol y el dimetilsulfóxido (DMSO) en la estructura

de YLSCP2.

2.1.c.i. Efecto del etanol sobre YLSCP2

Efecto del etanol sobre la estructura de YLSCP2 fue analizado mediante espectros de dicroísmo circular (CD) (Figura 4) y de emisión de fluorescencia (Figura 5) en función de la concentración del solvente. El agregado de etanol 0.01 - 5 % no perturba la emisión de fluorescencia ni el espectro de CD en el UV-cercano, indicando que este solvente no modifica la estructura terciaria de YLSCP2. Por otro lado, en los espectros de CD en el UV-lejano se observa un incremento de la señal con el agregado de etanol ~ 5 %. El efecto del etanol ~ 5 % es similar al obtenido a pH 9.0, ya que se produce un aumento del contenido de estructura secundaria sin afectar el contenido de estructura terciaria. En resumen, YLSCP2 no sufre cambios estructurales siempre y cuando la concentración de etanol sea menor al 5 %, por lo que es posible utilizar este solvente para disolver los ligandos hidrofóbicos.

2.1.c.ii. Efecto del dimetilsulfóxido sobre YLSCP2

El efecto del dimetilsulfóxido (DMSO) en YLSCP2 fue estudiado mediante fluorescencia de triptofano (Figura 6). El agregado de este solvente produce una atenuación abrupta de la intensidad de fluorescencia del triptofano de YLSCP2, sin desplazamiento del máximo de emisión. El estudio del efecto del DMSO sobre otras proteínas (lisozima [142], NAD⁺-sintetasa [143]) indica que este solvente se une de forma específica a sitios internos hidrofóbicos. Es probable que el DMSO se una a YLSCP2 induciendo la atenuación de la fluorescencia del triptofano. La disminución de la fluorescencia observada con DMSO 0.5 % (63 mM) podría corresponderse a una saturación los sitios de unión, ya que el solvente se encuentra en una proporción mucho mayor que la proteína (~ 2 μ M). Además, los posibles cambios del medio por el agregado de bajas cantidades de DMSO son mínimos, reforzando la posibilidad de la unión específica del solvente a la proteína. Sin embargo, es necesario contar con más resultados para poder confirmar la unión de DMSO a YLSCP2. Evidentemente, el DMSO no es un solvente adecuado para disolver los lípidos en los ensayos de unión a la proteína.

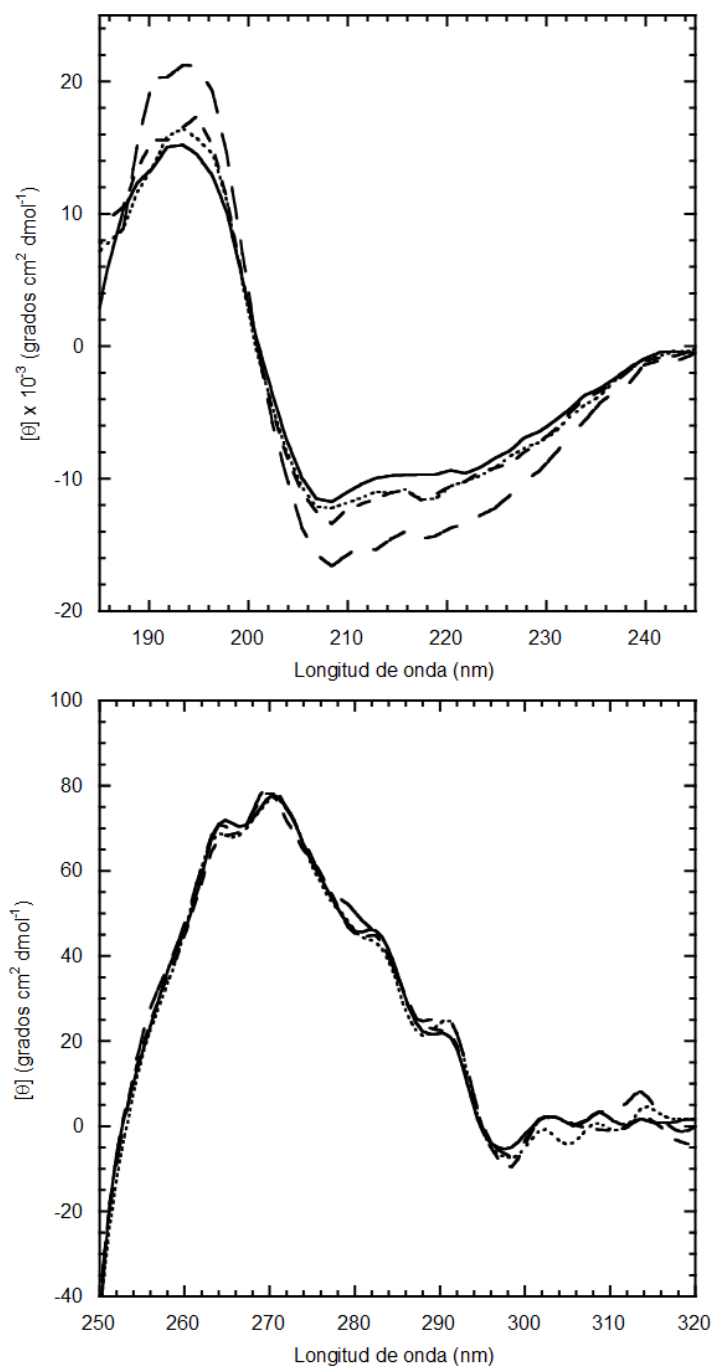


Figura 4. Espectros de dicroísmo circular de YLSCP2 en función de la concentración de etanol en el UV-lejano ($\sim 4 \mu\text{M}$, panel superior) y en el UV-cercano ($\sim 30 \mu\text{M}$, panel inferior). Las curvas de ambos gráficos se corresponden a 0 % etanol (línea negra), 0.1 % etanol (línea de rayas pequeñas), 1 % etanol (línea punteada), 5 % etanol (línea de rayas grandes).

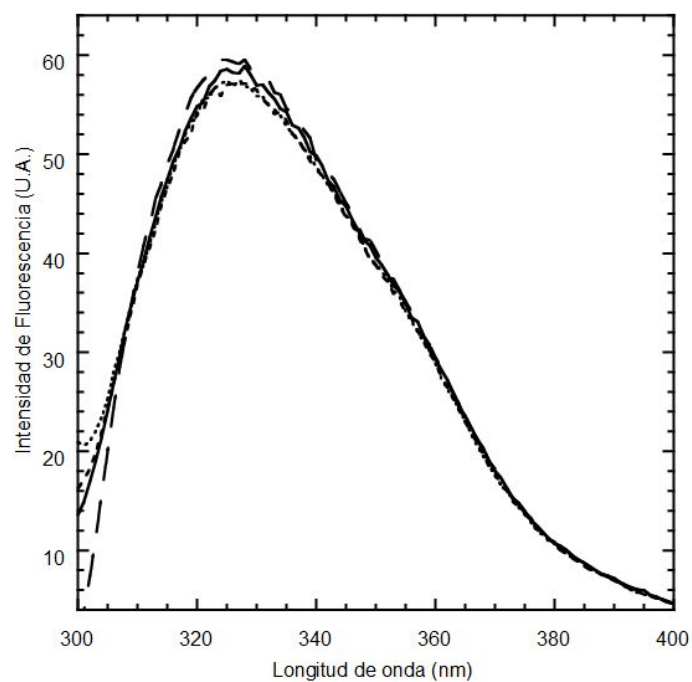


Figura 5. Espectros de emisión de fluorescencia de triptofano de YLSCP2 ($\sim 5 \mu\text{M}$) en función de la concentración de etanol luego de una longitud de onda de excitación de 290 nm. Las curvas se corresponden a 0 % etanol (línea negra), 0.1 % etanol (línea de rayas pequeñas), 1 % etanol (línea punteada), 5 % etanol (línea de rayas grandes).

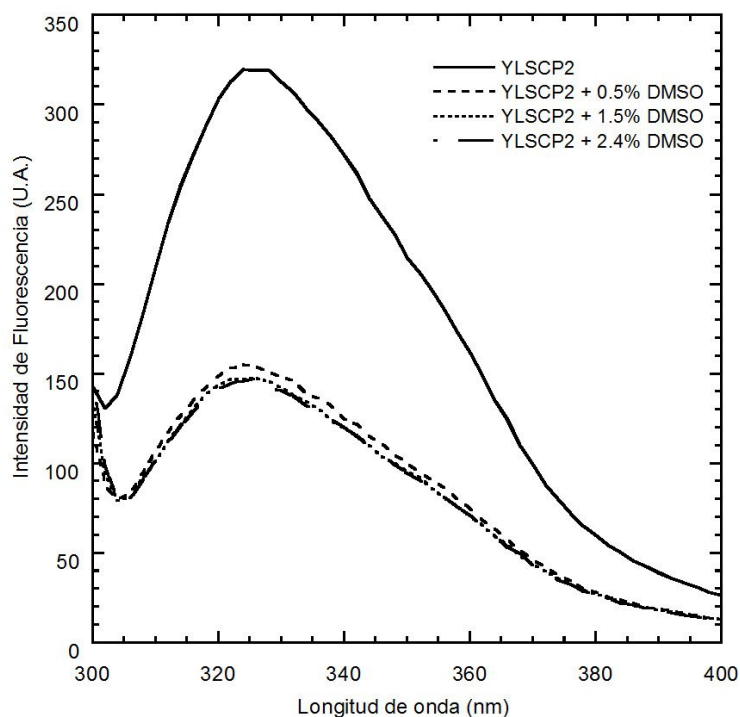


Figura 6. Espectros de fluorescencia del triptofano de YLSCP2 ($\sim 2 \mu\text{M}$) en función de la concentración de dimetilsulfóxido (DMSO) luego de excitar a una longitud de onda de 290 nm. La concentración de DMSO para cada curva se indica en el gráfico.

2.II. Desplegado de YLSCP2 inducido por temperatura

2.II.a. Contenido de estructura secundaria

La estabilidad de YLSCP2 en función de la temperatura fue estudiada mediante ensayos de despliegado inducido por temperatura. La señal de dicroísmo circular (CD) a 220 nm fue utilizada como sonda para seguir la pérdida del contenido de estructura secundaria de YLSCP2 (Figura 7). El despliegado de YLSCP2 fue realizado a distintos valores de pH (5.0, 7.0 y 9.0), presentando una reversibilidad del 70 % (medida a partir de la recuperación de la señal luego de enfriar). A partir del ajuste de un modelo de dos estados se obtuvieron los parámetros de despliegado para cada pH (Tabla II).

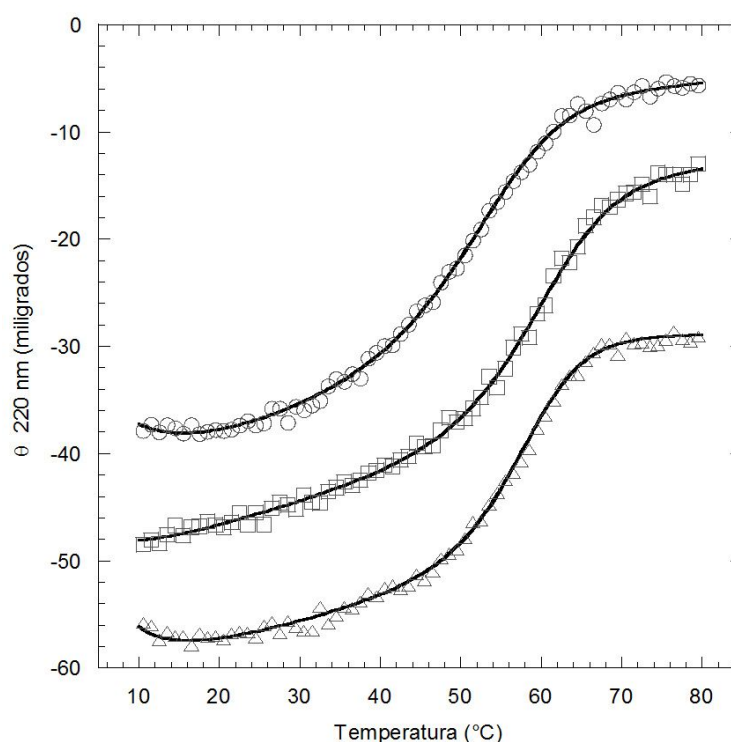


Figura 7. Desplegado de YLSCP2 ~ 5 μM (elipticidad molar) inducido por temperatura a pH 5.0 (círculos), 7.0 (cuadrados) y 9.0 (triángulos). Los ajustes correspondientes se representan como líneas.

El proceso de despliegado a pH 7.0 presenta una temperatura de fusión (T_m) de ~ 60 °C y un cambio de energía libre ($\Delta G^{25\text{ }^\circ\text{C}}$) de ~ 2.2 kcal mol⁻¹, lo que indica que YLSCP2 está bien plegada a temperatura ambiente. Por otro lado, a pH 5.0 se observa un descenso de 8 °C en T_m y una pérdida significativa de estabilidad. Esto concuerda con los resultados obtenidos en los espectros de CD en el UV-lejano y cercano.

Finalmente, a pH 9.0 tanto T_m como $\Delta G^{25\text{ }^\circ\text{C}}$ son similares a los valores a pH 7.0. Esto indica que la estabilidad de YLSCP2 es mayor en soluciones alcalinas, el mismo pH que fue reportado para el pH peroxisomal de levaduras creciendo en un medio con ácidos grasos de cadena larga [139].

Tabla II. Parámetros de desplegamiento de YLSCP2 en función del pH.

A partir de los datos de desplegamiento inducido por temperatura en función del pH fueron obtenidos los siguientes parámetros: la temperatura a la cual la energía libre es cero (T_m , $^\circ\text{C}$), la temperatura a la cual la estabilidad es máxima (T_x , $^\circ\text{C}$), la capacidad calorífica a presión constante (C_p , $\text{kcal mol}^{-1} \text{K}^{-1}$), la entalpía (ΔH^{T_m} , kcal mol^{-1}), la energía libre (ΔG^{T_x} , kcal mol^{-1}) y la entropía (ΔS , kcal mol^{-1}).

<i>pH</i>	<i>T_m</i>	ΔC_p	ΔH^{T_m}	<i>T_x</i>	ΔG^{T_x}
5.0	51.30 ± 0.20	1.23 ± 0.02	32.97 ± 0.58	25.57 ± 0.10	1.32 ± 0.02
7.0	59.25 ± 0.21	1.20 ± 0.02	42.33 ± 0.58	25.78 ± 0.10	2.16 ± 0.02
9.0	57.36 ± 0.12	1.76 ± 0.01	51.17 ± 0.37	29.52 ± 0.06	2.18 ± 0.03

Estos resultados están de acuerdo con los publicados para otros miembros de las SCP2 donde se reporta una inhibición de la transferencia de ligandos entre membranas mediada por SCP2 [133] y una disociación del ligando [97] producidas por el pH ácido. Nuestros resultados muestran que la estabilidad de YLSCP2 es menor a pH ácido, lo que podría alterar la actividad de la proteína.

2.II.b. Comportamiento hidrodinámico

La dispersión de rayos-X a bajo ángulo (SAXS) es una técnica clave en el estudio de macromoléculas porque permite obtener información del tamaño y la forma global en solución. A partir de las curvas SAXS de YLSCP2 en función de la temperatura (25 - 70 $^\circ\text{C}$) fue obtenido el "gráfico de Kratky" para cada espectro (Figura 8). El cambio en la forma de los espectros de SAXS de YLSCP2 inducido por la temperatura concuerda con un cambio en la forma y el tamaño de la proteína. Esto es evidente en el "gráfico de Kratky", donde el aumento de la temperatura produce una disminución de la intensidad y un corrimiento de la posición del máximo hacia valores de ángulos de dispersión (Q) menores. Además, las curvas tienen la forma acampanada a bajas temperaturas, indicando que la proteína presenta forma globular. A altas temperaturas las curvas pierden esa forma indicando la presencia de cadenas tipo *gaussiana*. Las curvas del "gráfico de Kratky" a 25 y 40 $^\circ\text{C}$ tienen una posición del máximo similar, mientras que lo mismo se observa en las curvas a 60 y 70 $^\circ\text{C}$. Este tipo de comportamiento sugiere un aumento del tamaño de la proteína y una transición de una forma globular a una forma tipo cadena

gaussiana entre 40 y 60 °C.

A partir de las curvas de SAXS de YLSCP2 en función de la temperatura fue calculada la función de densidad de pares de distancias (*PR*) con el programa GNOME, las cuales permiten determinar el radio de giro promedio (*RG*) de las distintas especies de la proteína (Figura 9). El valor promedio de *RG* aumenta entre 40 y 60 °C, de acuerdo con el análisis de las curvas de Kratky y con el comportamiento de la elipticidad de YLSCP2 a 220 nm en función de la temperatura (Figura 9). Sin embargo, a 60 °C se observa un *RG* similar al obtenido a 70 °C, indicando una transición anterior a la obtenida por dicroísmo circular (CD). Esto podría deberse a la disociación de los oligómeros de forma previa a la pérdida de la estructura secundaria de la proteína. El valor del *RG* de YLSCP2 a 70 °C (~ 36 Å) es menor que el esperado para la proteína en el estado desnaturalizado (~51 Å) [144][110]). Esto sugiere que el proceso de desplegamiento podría no estar completo a esa temperatura.

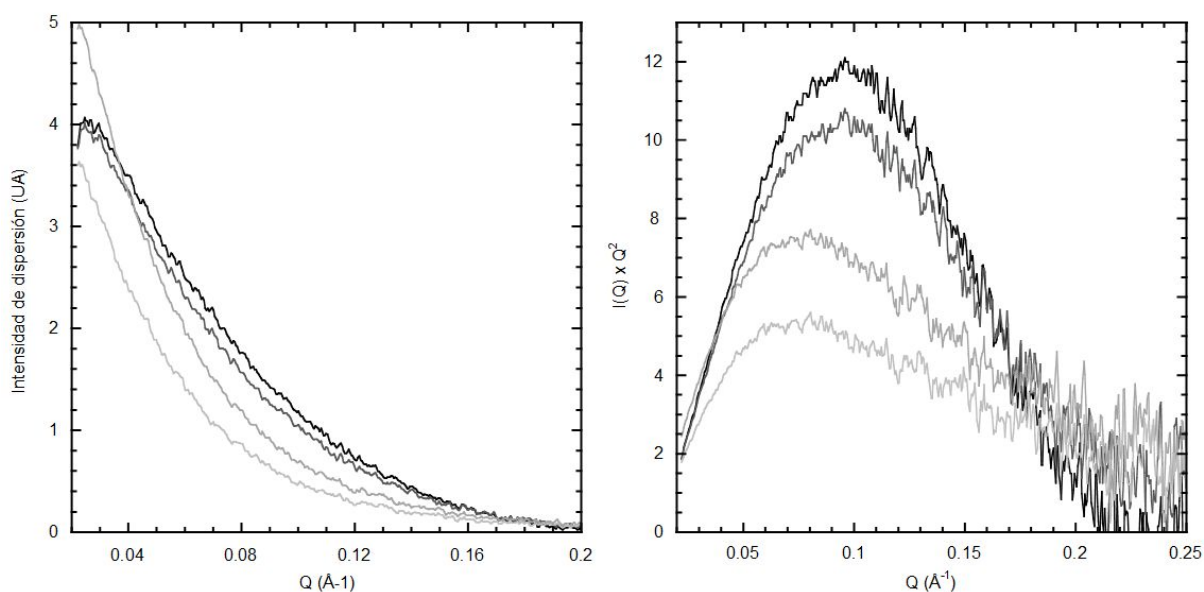


Figura 8. Espectros de SAXS de YLSCP2 ~ 160 μM (panel izquierdo) en función de la temperatura, (25, 40, 60 y 70 °C: líneas negra a gris, respectivamente) y "gráficos de Kratky" (panel derecho) obtenidos de los espectros SAXS de YLSCP2 en función de la temperatura (25, 40, 60 y 70 °C: líneas negra a gris, respectivamente).

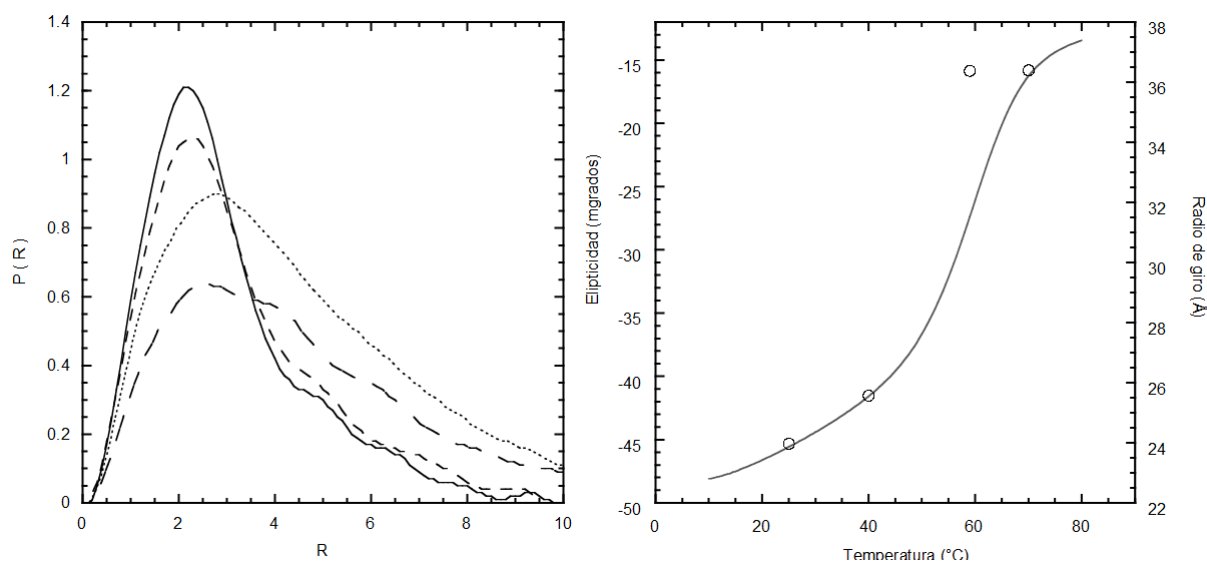


Figura 9. Función de distribución de pares de distancia ($P[R]$, panel izquierdo) en función de la distancia (R) a 25 °C (línea negra), 40 °C (línea de rayas chicas), 60 °C (línea de puntos) y 70 °C (línea de rayas grandes). En el panel derecho se muestran los valores de radio de giro obtenidos para cada temperatura (círculos) en comparación con la elipticidad de YLSCP2 en función de la temperatura (línea).

2.III. Estabilidad química de YLSCP2

2.III.a. Desplegado inducido con GuHCl

2.III.a.i. Fluorescencia

El efecto de los caótopos sobre la estructura de YLSCP2 fue determinado inicialmente midiendo la emisión de fluorescencia en ausencia y presencia de cloruro de guanidinio (GuHCl). La longitud de onda del máximo de emisión del triptofano (354 nm) en GuHCl ~ 7 M presenta un corrimiento de ~ 28 nm con respecto a YLSCP2 en el estado nativo, aunque la intensidad de emisión de fluorescencia no varía significativamente (Figura 10). En el capítulo I fueron comparados los espectros de fluorescencia de YLSCP2 y de triptofano libre (NATA), los cuales presentan una intensidad de emisión de fluorescencia similar. Estos resultados en conjunto sugieren que la intensidad de fluorescencia del triptofano de YLSCP2 en el estado nativo es atenuada por una interacción terciaria, aunque el mismo se encuentra oculto al solvente.

El triptofano de YLSCP2 se encuentra contiguo en secuencia a una tirosina. En el estado nativo no se detecta la contribución de la tirosina al espectro de fluorescencia luego de excitar a una longitud de onda de 273 nm. Esto puede deberse a una transferencia de energía desde la tirosina hacia el triptofano en el estado nativo. En el

espectro de fluorescencia obtenido para el estado desplegado de YLSCP2 (GuHCl ~ 7 M) luego de una excitación a 273 nm se pueden diferenciar las señales del triptofano y la tirosina (Figura 10).

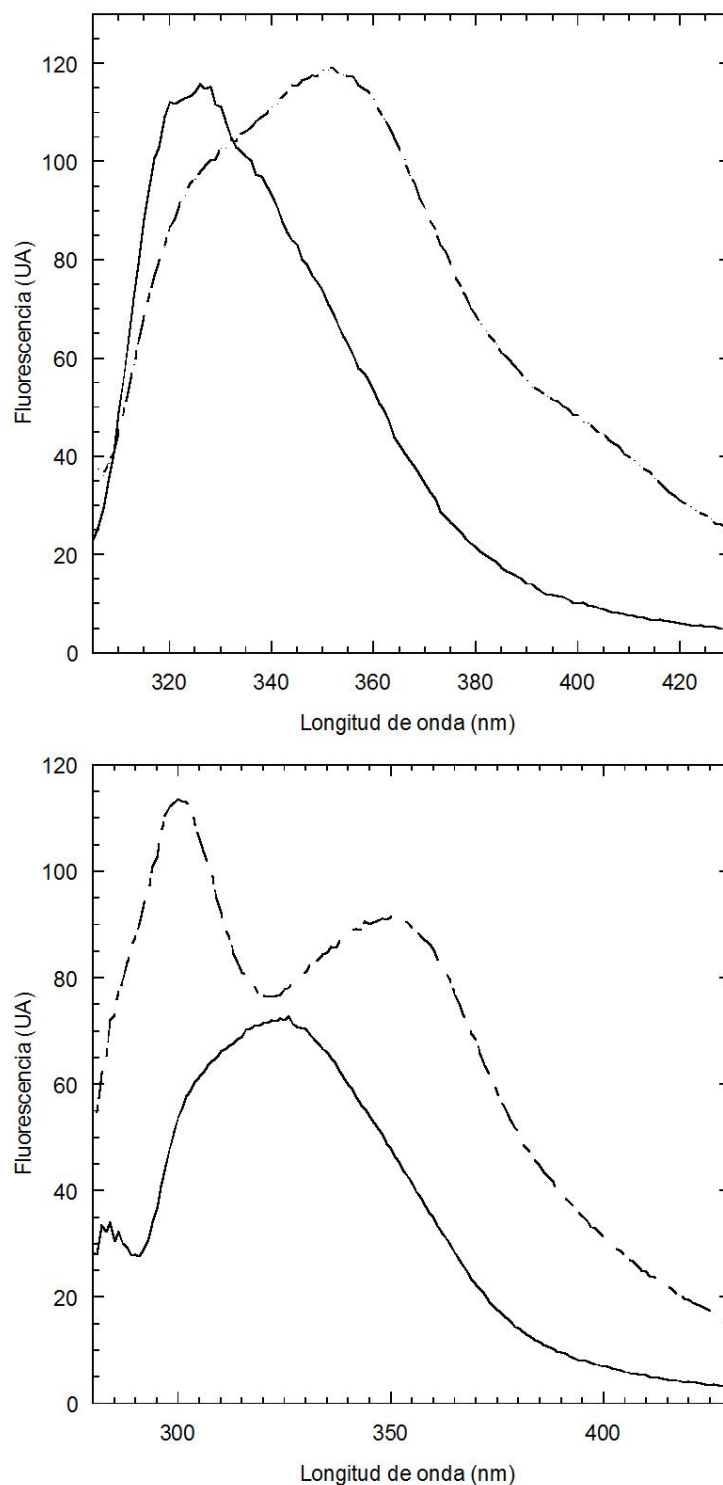


Figura 10. Espectros de fluorescencia de YLSCP2 ~ 1 μ M nativa (línea llena) y desplegada con GuHCl ~ 7 M (línea punteada), luego de excitar con una longitud de de 290 nm (panel superior) y de 273 nm (panel inferior).

2.III.b. Desplegado inducido con urea

2.III.b.i. Fluorescencia

El análisis del proceso de desnaturalización química de YLSCP2 fue realizado utilizando urea como caótrofo. El efecto de la urea sobre la estructura terciaria de YLSCP2 fue determinado midiendo los espectros de fluorescencia de triptofano en función de la concentración de urea (Figura 11). Entre 0 - 3.5 M urea se observa una atenuación progresiva de la fluorescencia del triptofano y un corrimiento hacia el rojo de la longitud de onda del máximo de emisión ($\lambda_{\text{máx}}$). Este es un comportamiento típico de un anillo de indol exponiéndose gradualmente a un solvente polar. Además, los espectros entre 0 - 3.5 M urea muestran que a la longitud de onda de ~ 352 nm el rendimiento cuántico de las especies involucradas es idéntico (lo que en absorbancia se conoce como punto isosbético). Este comportamiento sugiere la existencia de al menos una transición de dos estados entre 0 - 3.5 M urea. A concentraciones por encima de 3.5 M urea la intensidad de emisión comienza a aumentar (sin cambio significativo en $\lambda_{\text{máx}}$) y las curvas dejan de pasar por el mismo punto a la longitud de onda de ~ 352 nm. Esto indica la presencia de otra transición de desplegado por encima de 3.5 M urea. Además, este resultado sugiere que la emisión del triptofano está atenuada en el estado nativo, debido a una interacción nativa que se mantiene estable hasta 3.5 M urea.

Si bien la intensidad de emisión de fluorescencia varía de forma diferencial en función de la concentración de urea, la posición del máximo de emisión parece mantenerse constante luego de 3.5 M urea. Para analizar esto con más detalle fue analizado el centro de masa de cada espectro de fluorescencia de triptofano (Figura 11). La variación del centro de masa con la concentración de urea no presenta cambios significativos a concentraciones de urea mayores a 3.5 M. La concentración media de desnaturalizante para la cual la señal es un 50 % del valor inicial es 1.8 M para la intensidad de fluorescencia de triptofano y 2.0 M para el centro de masa de los espectros.

En el modelo estructural de YLSCP2 el triptofano (Trp 54) se encuentra interaccionando con una fenilalanina (Phe 13) a una distancia de ~ 4 Å, lo que sugiere la formación de una interacción π - π fuerte (Figura 12). Esta interacción también se encuentra presente en otras estructuras SCP2 [89][90], indicando un posible rol estructural conservado. Además, en la estructura de YLSCP2 también se observa un grupo amino cargado (Lys 69) a una distancia de ~ 7 Å del triptofano (Figura 12). Es probable que el comportamiento de la emisión de fluorescencia del triptofano de YLSCP2 en el desplegado por urea se deba a la interacción con uno o ambos de estos

residuos. Si es así, este resultado sugiere que parte de la estructura de YLSCP2 se mantiene organizada a bajas concentraciones de urea, ya que la atenuación del triptofano se mantiene hasta 3.5 M urea.

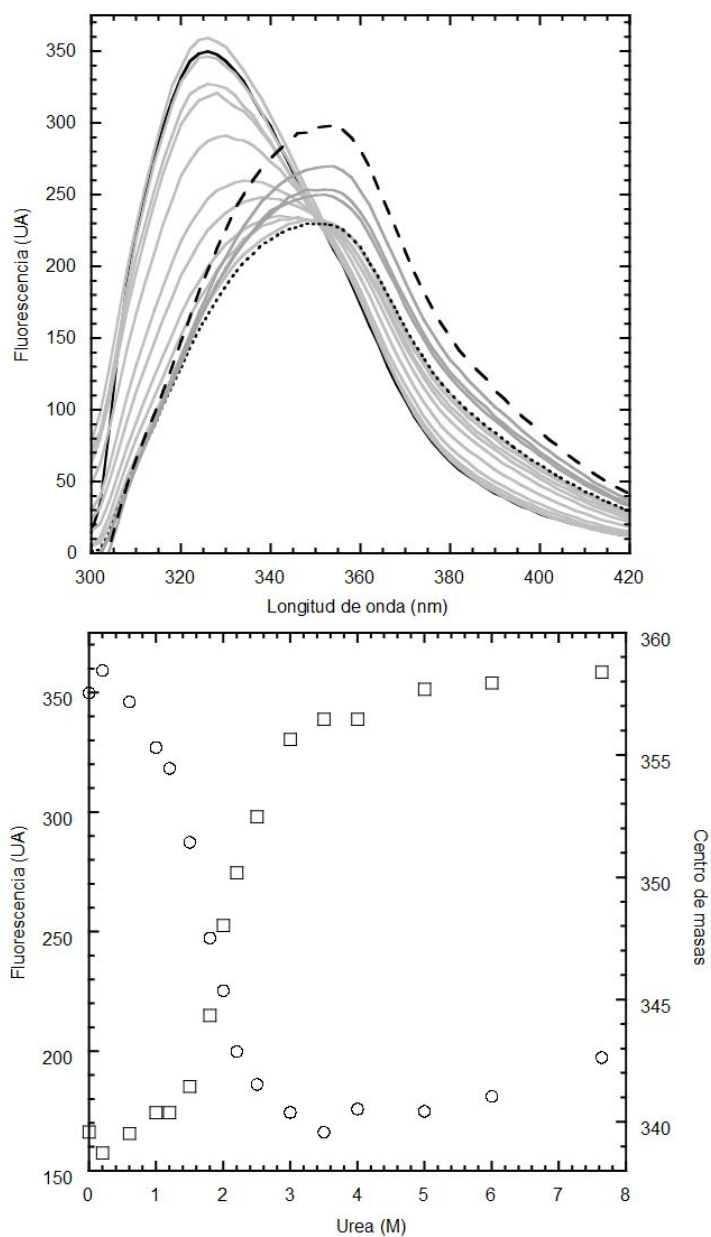


Figura 11. Espectros de fluorescencia de triptofano de YLSCP2 $\sim 5 \mu\text{M}$ en función de la concentración de urea (panel superior), donde se resaltan los espectros correspondientes a 0 M urea (línea negra), 3.5 M urea (línea punteada) y 7.6 M urea (línea de rayas). El comportamiento de la intensidad a 326 nm (círculos) y el centro de masa (cuadrados) de los espectros en función de la concentración de urea se presentan en el panel inferior.

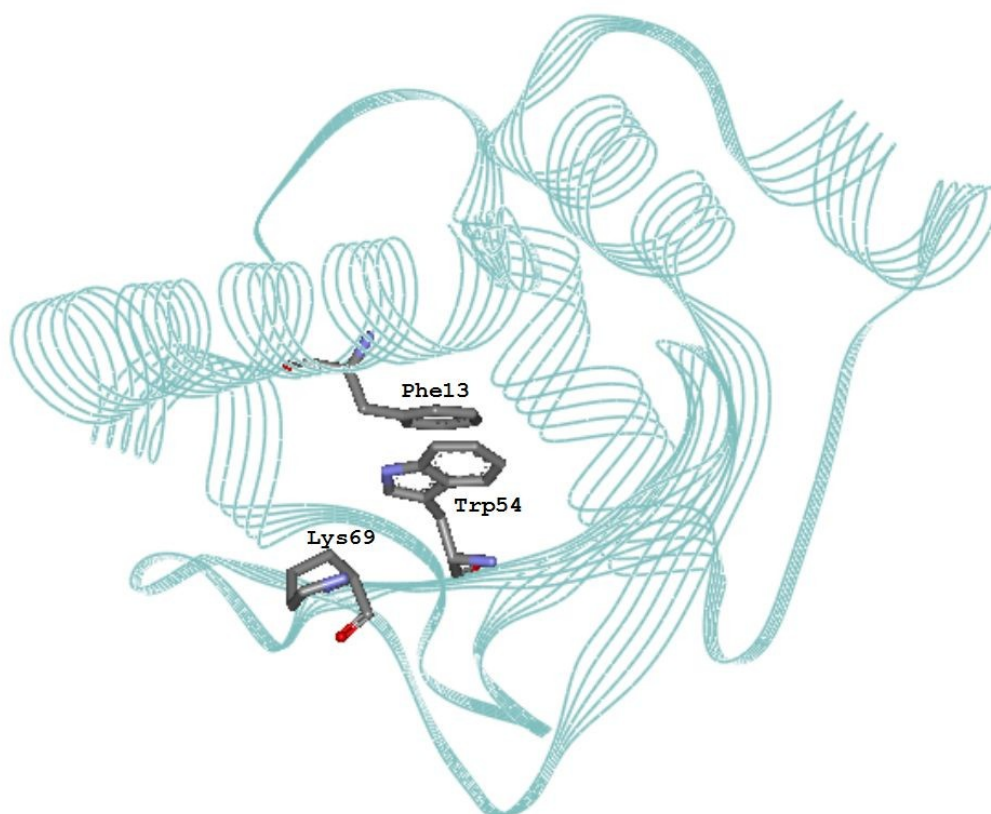


Figura 12. Estructura modelo de YLSCP 2 mostrando la ubicación del triptofano 54 (Trp 54), la fenilalanina 13 (Phe 13) y la lisina 69 (Lys 69). Los colores de los residuos corresponden a los elementos carbono (gris), nitrógeno (azul) y oxígeno (rojo).

2.III.b.ii. Dicroísmo circular

El contenido de estructura secundaria de YLSCP2 en función de la concentración de urea fue analizado mediante dicroísmo circular (CD). Los espectros de CD de YLSCP2 en el UV-lejano muestran una pérdida cooperativa del contenido de estructura secundaria en función del aumento de desnaturizante (Figura 13). La elipticidad molar a 220 nm en función de la concentración de urea está de acuerdo con el comportamiento de la fluorescencia del triptofano, corroborando la presencia de una transición no cooperativa por encima de 3.5 M urea (Figura 13).

El espectro de CD de YLSCP2 a 0.2 M urea (Figura 13, línea gris punteada) presenta un aumento de intensidad con respecto a YLSCP2 sin agregado de urea. Luego se observa una disminución progresiva de la elipticidad molar a altas concentraciones de desnaturizante. A 3.5 M urea todavía se observa algo de señal, lo que indica la presencia de estructura remanente. La concentración media de desnaturizante para la cual la señal de CD a 220 nm es un 50 % del valor inicial es 1.7 M, similar a la obtenida para la intensidad de fluorescencia de triptofano.

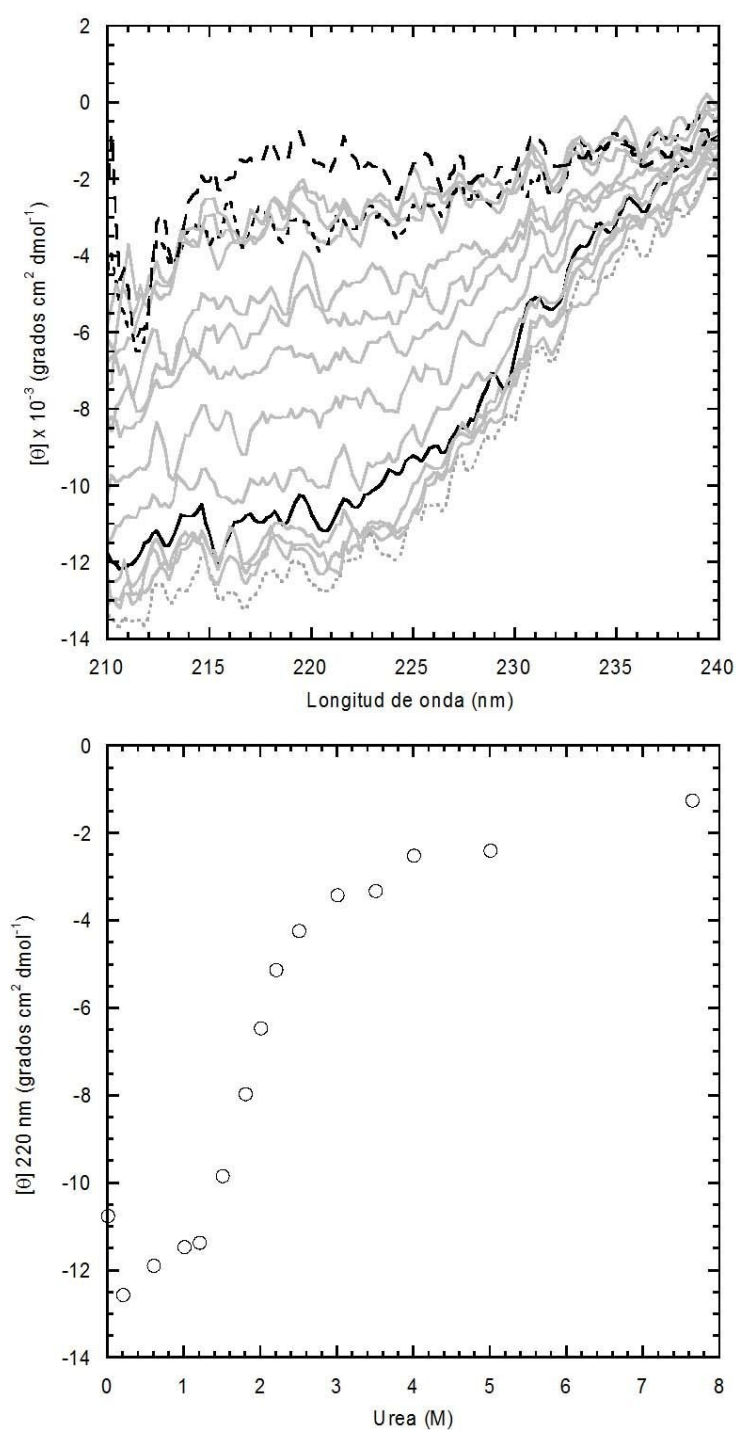


Figura 13. Espectros de dicroísmo circular en el UV-lejano de YLSCP2 ~ 5 μM en función de la concentración de urea (panel superior), donde se resaltan los espectros correspondientes a 0 M urea (línea negra), 0.2 M urea (línea punteada gris), 3.5 M urea (línea punteada) y 7.6 M urea (línea de rayas). El comportamiento de la elipticidad a 220 nm (círculos) en función de la concentración de urea se presenta en el panel inferior.

2.III.b.iii. Unión de ácido 1-anilinaftalen-8-sulfónico

El compuesto fluorescente ácido 1-anilinaftalen-8-sulfónico (ANS) fue utilizado como sonda para develar si el comportamiento de la fluorescencia del triptofano en función de la concentración de urea se correspondía con la presencia de un estado intermediario de desplegado. Para esto fue medida la fluorescencia del ANS agregando en un exceso molar del reactivo (3:1) en las muestras de YLSCP2 con diferentes concentraciones de urea (Figura 14). Los espectros obtenidos indican que el ANS se une a YLSCP2 en el estado nativo (0 M urea) presentando un aumento de la intensidad de fluorescencia (Figura 14, línea negra). A medida que la concentración de urea aumenta de 0 a 3.5 M la intensidad de fluorescencia del ANS disminuye y la longitud de onda del máximo de emisión cambia de 480 a 490 nm. Entre 3.5 y 7.6 M urea los espectros presentan un leve aumento de la intensidad de fluorescencia. El análisis de la intensidad de emisión de fluorescencia del ANS a 480 nm en función de la concentración de urea presenta una transición centrada en 1.5 M urea (Figura 14). Este valor es menor que el obtenido para las otras sondas, indicando que la exposición de la cavidad de unión de ligandos es preliminar a la pérdida total de la estructura.

Los espectros de fluorescencia del ANS, al igual que los de fluorescencia de triptofano, indican la presencia de una transición no cooperativa a concentraciones mayores que 3.5 M urea. El ANS fue elegido inicialmente como sonda para detectar estados parcialmente plegados, pero resultó actuar como ligando de YLSCP2.

2.III.b.iv. Dispersión de rayos-X a bajo ángulo

El efecto de la urea sobre la globularidad y el estado de agregación de YLSCP2 fue estudiado mediante espectros de dispersión de rayos-X a bajo ángulo (SAXS) en función de la concentración de urea. La forma de los espectros de SAXS cambia y la intensidad disminuye con el aumento de la concentración de urea (datos no presentados).

El radio de giro (RG) de YLSCP2 fue obtenido para cada concentración de urea mediante la "aproximación de Porod". El RG de YLSCP2 a 0 M urea es 18.5 ± 0.7 Å y se corresponde con el RG esperado para un dímero de YLSCP2. Al aumentar la concentración de urea se observa un aumento del RG desde 18.5 Å hasta 36.7 Å (Figura 15). La concentración de urea media (C_m) obtenida para esta transición a partir de los datos de SAXS fue ~ 1.5 M, valor ligeramente menor que el obtenido por otras técnicas. Esto puede ser consecuencia del comienzo del proceso de disociación del dímero previamente a de desplegado.

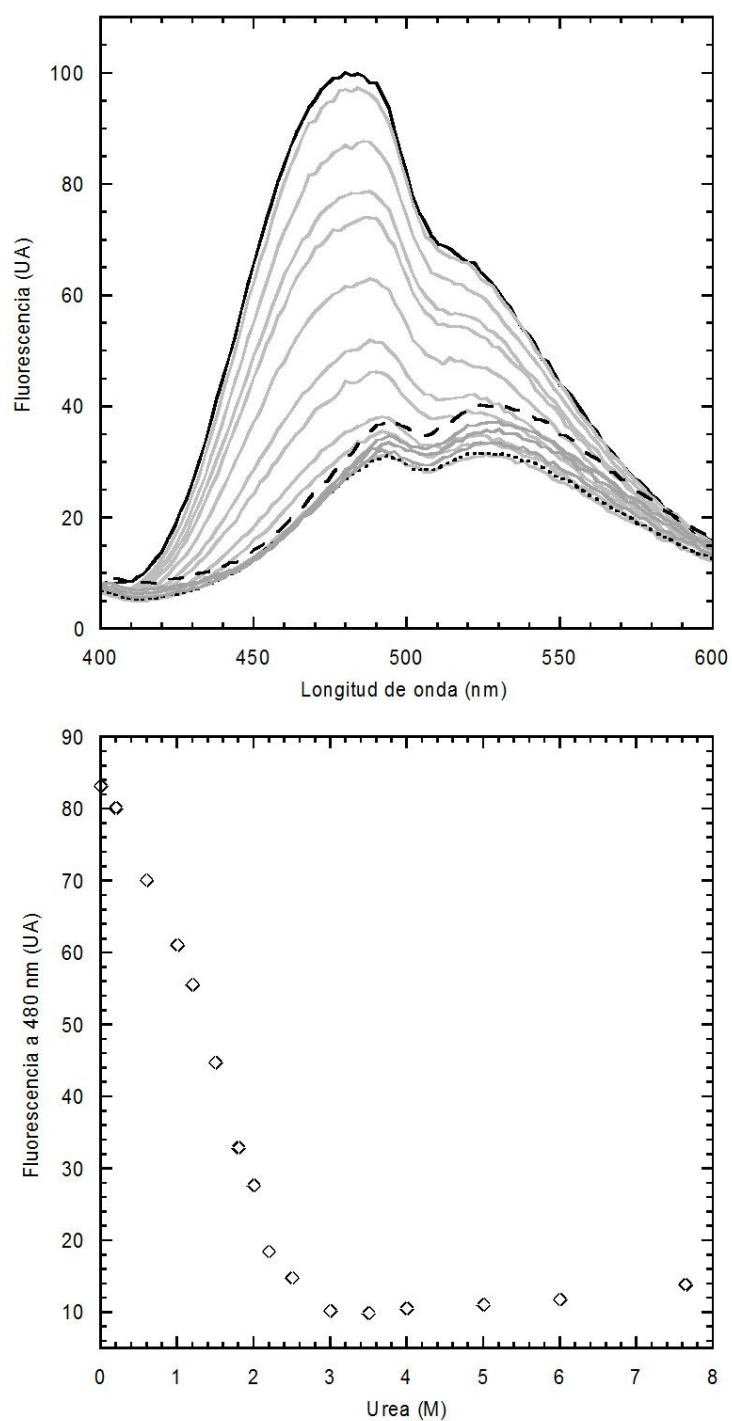


Figura 14. Fluorescencia de ANS unido a YLSCP2 $\sim 5 \mu\text{M}$ en función de la concentración de urea. En el panel superior se presentan los espectros de emisión de fluorescencia de ANS indicando la curva correspondiente a 0 M urea (línea negra), 3.5 M urea (línea punteada) y 7.6 M urea (línea a rayas). La intensidad de emisión de fluorescencia de ANS a 480 nm (rombos) en función de la concentración de urea se presenta en el panel inferior.

Los "gráficos de Krakty" a 0, 0.6 y 0.95 M urea presentan forma de campana, indicando que YLSCP2 posee una estructura nativa globular y compacta a estas concentraciones de desnaturalizante (Figura 16). Por encima de 1.46 M urea los "gráficos de Krakty" de YLSCP2 presentan una forma de meseta a valores de Q altos, indicando la presencia de una estructura del tipo "cadena Gausiana" [112]. A partir de estos datos se puede ubicar el punto medio de la transición entre las concentraciones 1 y 1.5 urea.

El valor del RG obtenido a 6.8 M urea (36.7 Å) es bastante menor al esperado para una proteína desplegada de 129 aminoácidos (~ 51 Å) [110][144]). Por encima de 3 M urea el RG aumenta de forma no cooperativa, lo mismo que se observa con las otras sondas analizadas. Esto sugiere que a ~ 7 M urea no se alcanza una desnaturalización completa de YLSCP2, aunque los "gráficos de Krakty" indiquen la pérdida de globularidad.

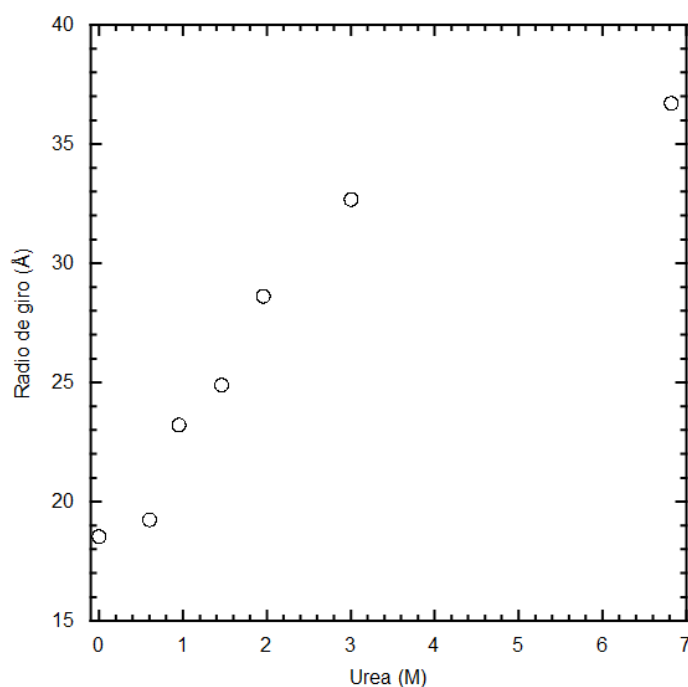


Figura 15. Radio de giro de las muestras de YLSCP2 ~ 280 μ M (círculos blancos) en función de la concentración de urea.

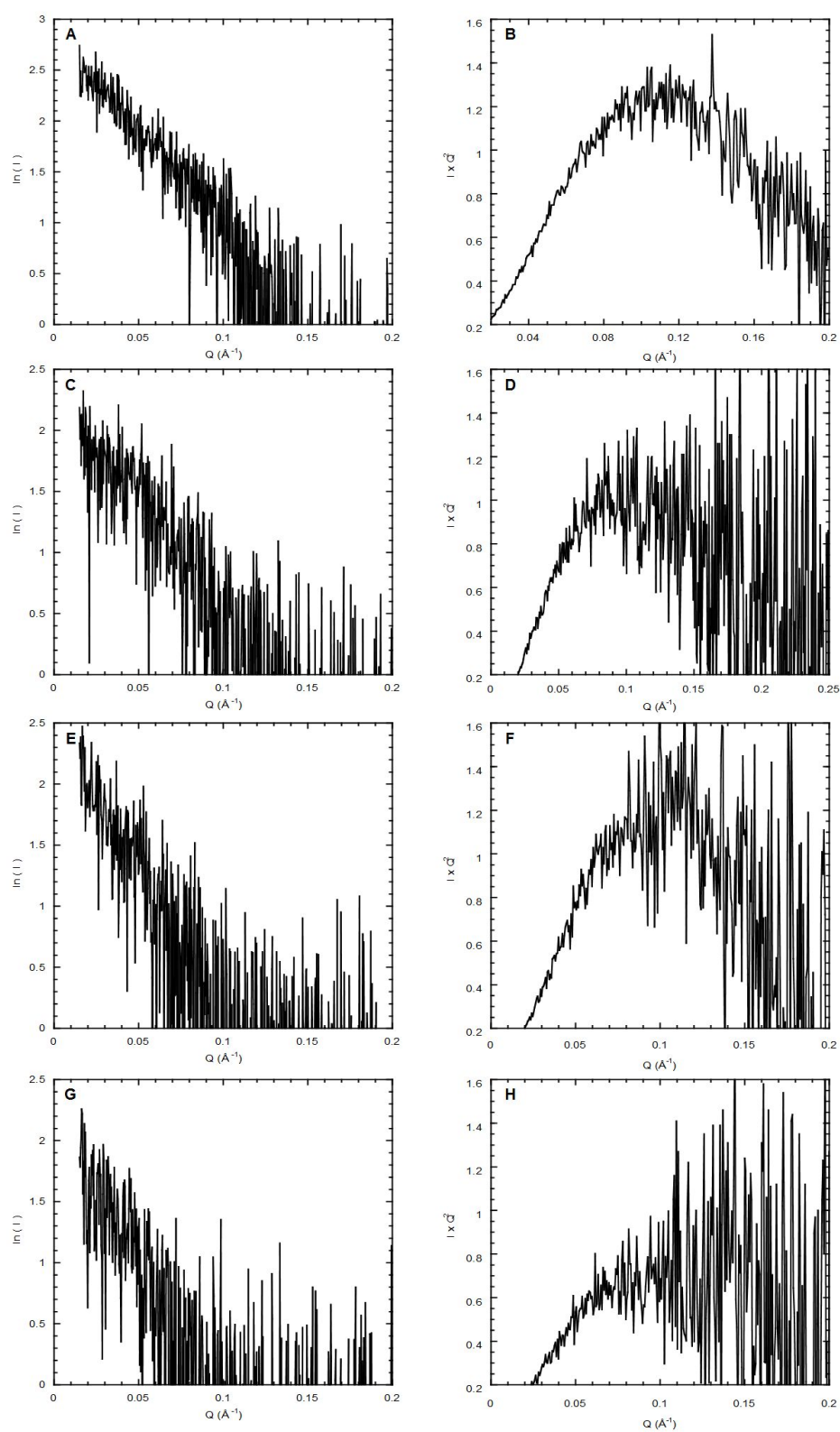


Figura 16. Espectros de SAXS (A, C, E, G) y "gráficos de Kratky" (B, D, F, H) de YLSCP2 ~ 280 μM a una concentración de urea, 0 M (A y B), 0.60 M (C y D), 0.95 M (E y F) y 1.46 M

(G y H).

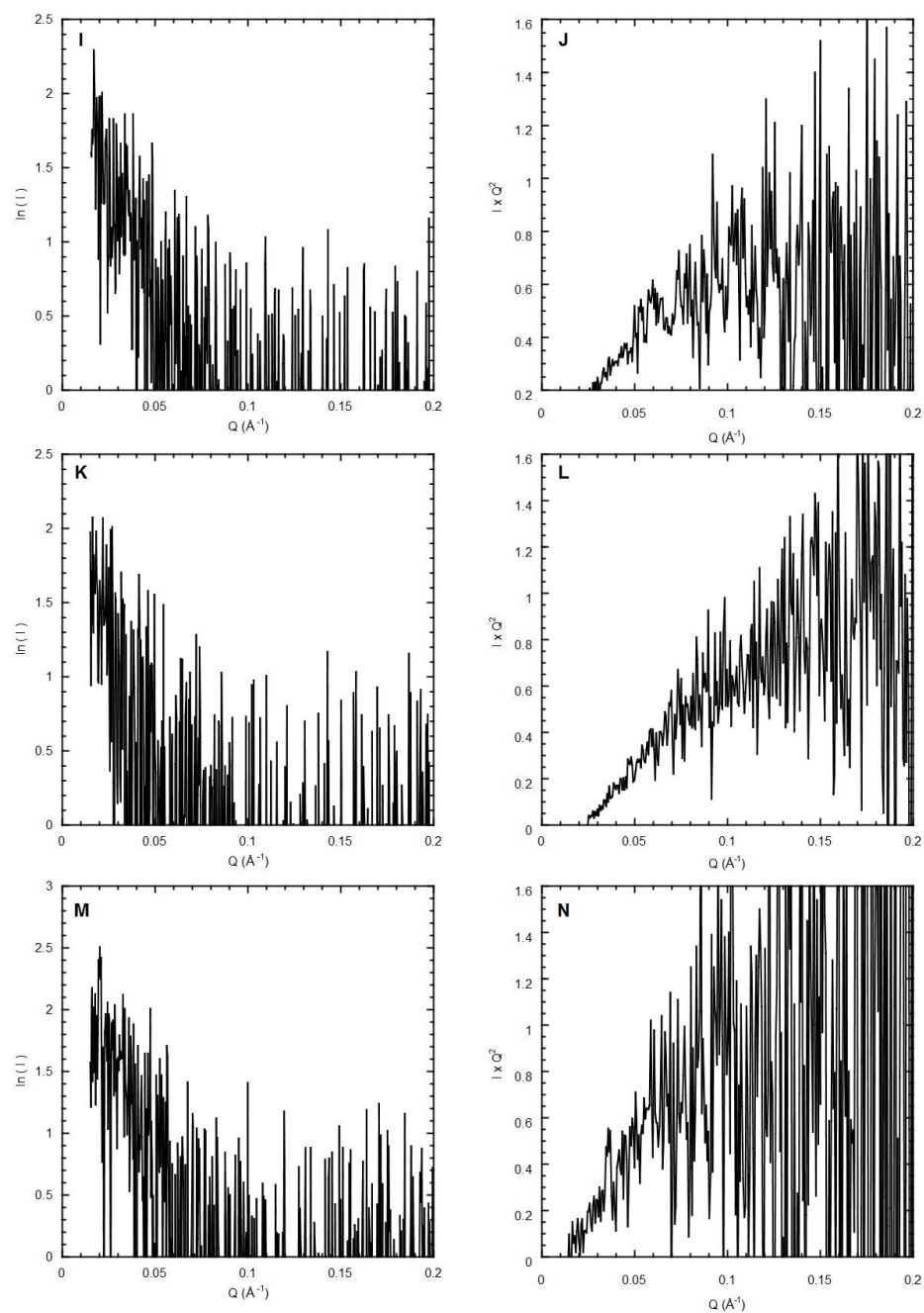


Figura 16- Continuación. Espectros de SAXS (I, K, M) y "gráficos de Kratky" (J, L, N) de YLSCP2 ~ 280 μ M a una concentración de urea, 1.96 M (I y J), 3.0 M (K y L) y 6.82 M (M y N).

2.III.b.v. Método de diagramas de fase

Los datos obtenidos para el despliegado de YLSCP2 demuestran que este proceso no es simple. Los espectros de fluorescencia de triptofano y de ANS muestran claramente que el despliegado de YLSCP2 presenta al menos dos transiciones. Además, a bajas

concentraciones de urea se observan leves aumentos de la fluorescencia de triptofano y de la elipticidad molar, mientras que la emisión de fluorescencia del ANS decrece. Esto podría indicar la presencia de una tercera transición, haciendo más complejo el proceso de desplegado.

Para develar la cantidad de transiciones presentes en el desplegado de YLSCP2 por urea fue realizado un procesamiento de los datos espectroscópicos denominado "método de los diagramas de fases" [145]. Este análisis está basado en que cualquier señal espectroscópica a una longitud de onda determinada (I_λ) puede ser representada como una combinación lineal de un número finito de componentes espectrales originados por cada una de las especies involucradas en el espectro. Se puede demostrar que para una transición altamente cooperativa entre dos conformaciones (detectadas a las longitudes de onda λ_1 y λ_2) el gráfico de I_{λ_1} versus I_{λ_2} debe ser lineal [145]. Una desviación de la linealidad refleja la existencia de un equilibrio complejo o de baja cooperatividad. Además, los segmentos lineales de un diagrama de fase pueden ser asociados con transiciones individuales.

Los diagramas de fase correspondientes a la desnaturalización de YLSCP2 inducida por urea fueron calculados para cada sonda y para una combinación de ellas (Figura 17). El diagrama de fase obtenido a partir de los espectros de CD en el UV-lejano (220 nm versus 230 nm) muestra en principio una única línea recta (Figura 17A). Esto sugiere que la pérdida de estructura secundaria ocurre siguiendo una única transición, pero el ruido que presenta la señal de CD podría esconder algún cambio en la pendiente del diagrama. Por otro lado, el diagrama de fase de fluorescencia del triptofano (326 nm versus 354 nm) presenta al menos dos líneas rectas con un punto de corte en 3.5 M urea, indicando la presencia de al menos dos transiciones (Figura 17B). En este diagrama se puede observar también otro posible quiebre cerca de 1 M urea. El diagrama de fluorescencia de ANS (540 nm versus 480 nm) muestra dos transiciones con un punto de quiebre a 3.5 M urea (Figura 17C). Finalmente, el diagrama de fase combinado (fluorescencia de ANS a 480 nm versus elipticidad molar a 220 nm) muestra al menos tres regiones bastante definidas, con puntos de quiebre en 1.2 y 3.5 M urea (Figura 17D). Estos resultados indican que el proceso de desplegado de YLSCP2 en equilibrio presenta dos o más estados intermedios parcialmente plegados.

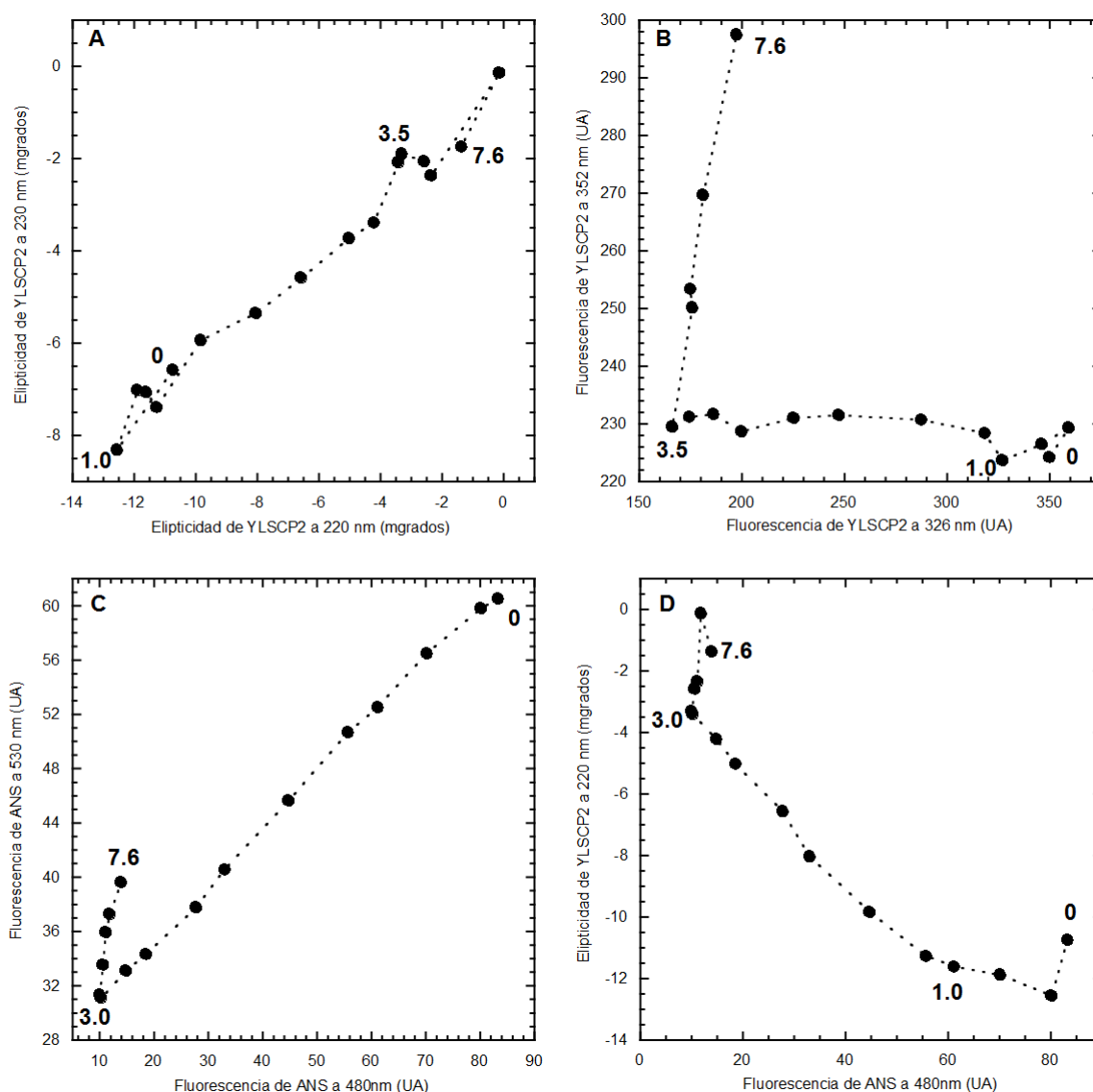


Figura 17. Diagramas de fases de las sondas utilizadas para medir el desplegamiento de YLSCP2 inducido con urea. (A) Elipticidad a 220 nm versus 230 nm, (B) Intensidad de fluorescencia del triptofano a 326 nm versus 354 nm, (C) Intensidad de fluorescencia de ANS a 530 nm versus 480 nm, y (D) Elipticidad a 220 nm versus Intensidad de fluorescencia de ANS a 480 nm. La concentración de urea se indica en los puntos donde se observa un quiebre.

2.III.b.vi. Ajuste de un modelo de desplegamiento de tres estados

El análisis de los diagramas de fase indica la presencia de al menos tres transiciones o cuatro estados (se observan tres pendientes en los gráficos). Sin embargo, es evidente a partir de los espectros de fluorescencia de triptofano y de ANS que la transición que ocurre después de 3.5 M urea no es cooperativa. En base a esto, un modelo de desplegamiento de tres estados (Capítulo VI) fue ajustado a los resultados experimentales obtenidos a

concentraciones de urea menores a 3.5 M. Para esto fue realizado un ajuste múltiple a los datos de intensidad de fluorescencia de triptofano a 326 nm, centro de masa de los espectros de fluorescencia de triptofano, elipticidad molar a 220 nm y fluorescencia de ANS a 480 nm, hasta 3.5 M urea (Figura 18). A partir de este ajuste se obtuvieron los parámetros termodinámicos asociados a las transiciones centradas a 1.4 y 1.9 M urea, con un ΔG_{H_2O} global de ~ 6 kcal mol⁻¹ (Tabla IV).

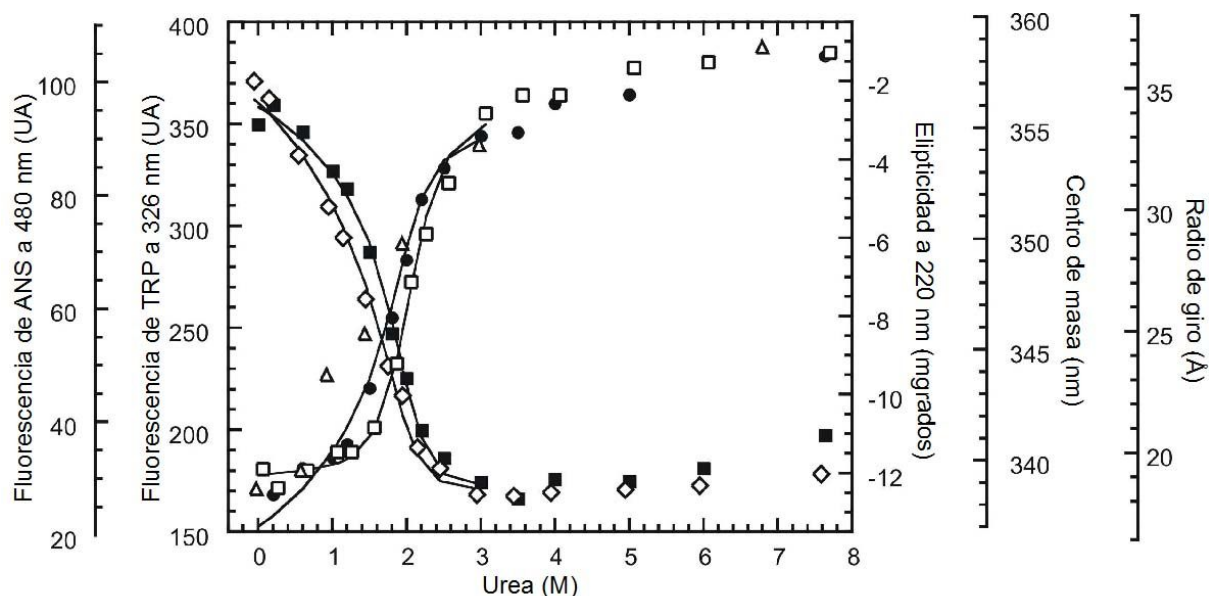


Figura 18. Ajuste del modelo de desplegamiento de 3 estados a los datos de fluorescencia del triptofano a 326 nm (cuadrados negros), centro de masa de la fluorescencia del triptofano (cuadrados blancos), elipticidad a 220 nm (círculos negros) y la fluorescencia de ANS a 480 nm (rombos blancos). También se presenta en el gráfico los valores de R_G (triángulos blancos) en función de la concentración de urea, aunque los mismos no se utilizaron en el ajuste.

Tabla IV. Parámetros termodinámicos obtenidos para el desplegamiento de YLSCP2 por el agregado de urea.

Ajustamos un modelo de tres estados a los datos experimentales (número de datos = 44; parámetros ajustados = 19; $\chi^2=0.91$).

Transición	ΔG_{H_2O} [kcal mol ⁻¹]	m [kcal mol ⁻¹ M ⁻¹]	C_m [M]
N $\leftrightarrow$ I	1.1 ± 0.3	0.8 ± 0.2	1.4 ± 0.1
I $\leftrightarrow$ U	4.7 ± 0.5	2.5 ± 0.1	1.9 ± 0.1

El valor de energía libre obtenido para YLSCP2 es mayor que el reportado para la desnaturalización de hSCP2 por cloruro de guanidinio (GuHCl) [131]. De todas formas, los procesos de desplegamiento inducido por diferentes caótopos pueden no ser idénticos. Además, el trabajo donde se estudia la estabilidad de hSCP2 sólo presenta el cambio de señal de dicroísmo circular con respecto a la concentración de GuHCl. Al utilizar una única

sonda no se puede determinar si el proceso de desplegado de hSCP2 involucra más de dos estados.

3. Discusión

La actividad de las SCP2 se ve alterada por los cambios de pH y por el agregado de solventes, lo que podría estar relacionado con su función biológica. Sin embargo, no se han realizado suficientes estudios de estabilidad de las SCP2 en función de estos factores. Para comprender exactamente porque la unión de ligandos se afecta en estos casos es indispensable conocer la estabilidad estructural y termodinámica de las SCP2.

La estabilidad de YLSCP2 en función del pH demuestra que esta proteína es más estable a pH básico (7.0 - 9.0) que a pH ácido (5.0), lo cual podría tener relevancia biológica. Está demostrado que YLSCP2 se localiza en peroxisomas, organelas especializadas en la degradación de lípidos. En varios trabajos fue demostrado que el pH del lumen peroxisomal es diferente al pH citoplasmático, aunque hay controversias en cuanto al valor de este pH. En el caso de *Saccharomyces cerevisiae* [139], fibroblastos humanos [138] y el hongo *Penicillium chrysogenum* [137] fue reportado un pH peroxisomal básico. Mientras que el pH peroxisomal es ácido en el caso de las levaduras *Hansenula polymorpha* [140], *Candida boidinii* y *Hansenula polymorpha* [141].

Aunque no está reportado el pH peroxisomal de *Y. lipolytica*, se sabe que el agregado de ácido octanoico al medio de cultivo (80 mg/L) acidifica el pH intracelular de esta levadura de 7.1 a 5.4 unidades [146]. Esto se debe a que el ácido octanoico ingresa a la célula como una molécula no disociada y una vez adentro se disocia acidificando el citosol. Además, el cambio de pH del medio induce una respuesta morfológica en *Y. lipolytica*, la cual crece como levadura a pH ácido y a pH neutro presenta un crecimiento tipo filamentoso [147][148]. Estos resultados sugieren que el pH es importante en varias funciones biológicas de *Y. lipolytica*, pero es necesario contar con mayor información al respecto para interpretar la estabilidad de YLSCP2 a pH básico.

Por otro lado, el etanol no produce efectos significativos sobre la estructura secundaria y terciaria de YLSCP2 cuando se encuentra a concentraciones menores que el 5 %. Existen varios trabajos que reportan una disminución de la afinidad de las SCP2 por sus ligandos en presencia de etanol [134]. Por ejemplo, una concentración de etanol del 0.1 % inhibe la unión de ácido NBD-esteárico a hSCP2 [135]. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que este solvente en bajas concentraciones no afecta la estructura de YLSCP2. Este solvente puede utilizar para disolver algunos ligandos lipídicos poco solubles en agua sin alterar la estructura de YLSCP2.

Los parámetros termodinámicos determinados a partir del análisis del desplegado de

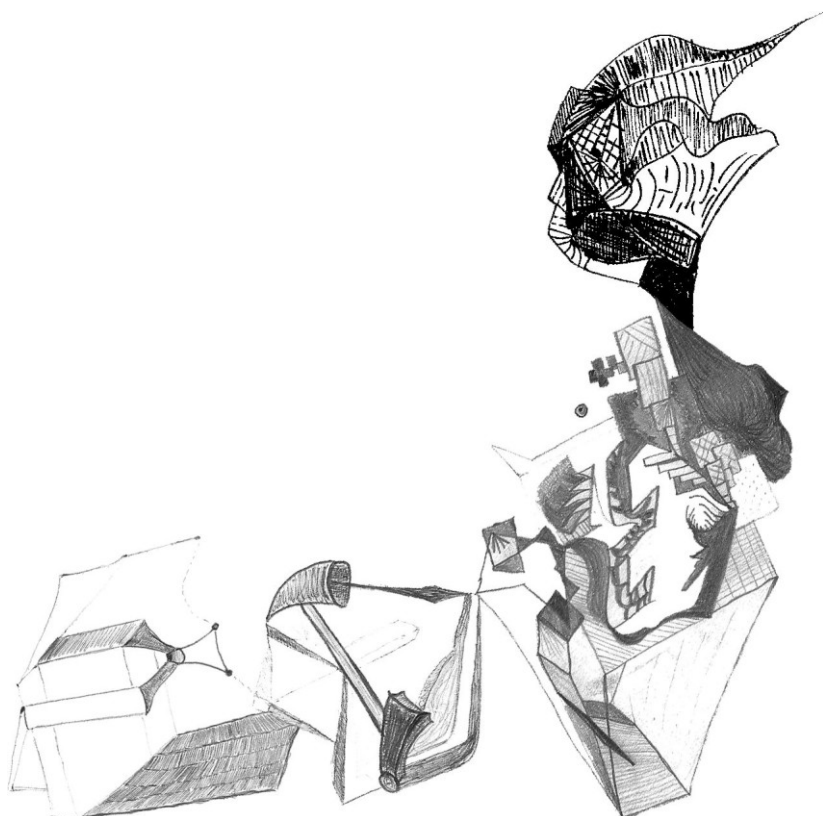
YLSCP2 inducido por temperatura son similares a los reportados para rSCP2 (pérdida de actividad a $\sim 60\text{ }^{\circ}\text{C}$) y hSCP2 (T_m de $\sim 70\text{ }^{\circ}\text{C}$ y ΔHT_m de $\sim 42\text{ kcal mol}^{-1}$). El valor obtenido para ΔC_p es menor al esperado para una proteína del tamaño de YLSCP2, sugiriendo una pequeña diferencia de superficie expuesta al solvente entre los estados nativo y desplegado. Además, el radio de giro de YLSCP2 a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ es menor que el esperado para esta proteína en el estado desplegado. Una posible explicación para estos resultados es que el proceso de desnaturalización no fue completo. Sin embargo, también es probable que YLSCP2 en el estado nativo presente mayor superficie expuesta que otras proteínas de su mismo tamaño debido a la cavidad hidrofóbica de unión. La estructura tridimensional propuesta para YLSCP2 presenta un 26 % del área hidrofóbica accesible al solvente que corresponde a residuos de la cavidad de unión putativa. Por ejemplo, un 32 % de los residuos de YLSCP2 se encuentran expuestos al solvente, mientras que en la lisozima (128 aminoácidos) sólo un 23 % de los residuos están expuestos.

En el desplegamiento de YLSCP2 inducido por el agregado de urea se observaron al menos tres transiciones (1.4, 1.9 y $> 3.5\text{ M}$ urea). La última transición observada es un proceso no cooperativo que no se completa antes de 7 M urea. El valor del ΔGH_{2O} global ($\sim 6\text{ kcal mol}^{-1}$) es mayor al reportado para hSCP2 en función del agregado de cloruro de guanidinio ($\Delta GH_{2O} \sim 3.6\text{ kcal mol}^{-1}$). De todas formas, el desplegamiento de hSCP2 (analizado mediante fluorescencia y dicroísmo circular) fue analizado como un proceso de desplegamiento de dos estados y no siempre son similares los parámetros obtenidos con diferentes tipos de caótropos.

Estos resultados, junto con los obtenidos para la caracterización estructural, brindan información importante para la interpretación de los ensayos de actividad de YLSCP2 que presentamos en el siguiente capítulo.

Capítulo IV

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE YLSCP2



1. Introducción

1.1. Perfil de unión de ligandos de SCP2

El rango de ligandos que unen las SCP2 es muy amplio, presentando una alta afinidad para ácidos grasos, ácidos grasos modificados con Coenzima A (acil-CoA), fosfolípidos, esteroides y otros lípidos [47][149]. Las estructuras reportadas para SCP2 en complejo con ligandos [89][90][94] y los estudios de RMN [83][85] indican una gran plasticidad conformacional del sitio de unión. Sin embargo, actualmente no está claro el mecanismo de unión de ligandos a SCP2, como tampoco su relación con la función biológica de esta familia de proteínas.

Las constantes de afinidad que se han reportado aportan información valiosa para develar el mecanismo de unión de ligandos a las SCP2. Sin embargo, la mayoría de estas constantes corresponden a SCP2 de mamíferos, mientras que ninguna se conoce para microorganismos (levaduras, bacterias, arqueas) ni para artrópodos. A continuación se resumen los resultados publicados por otros autores para la unión de distintas clases de lípidos a las SCP2.

1.1.a. Esteroides

La unión de colesterol a SCP2 fue estudiada mediante competición seguida por FRET [56], resonancia de plasmones de superficie (SPR) [150], unión de análogos fluorescentes del colesterol (colestatrienol [98], dehidroergosterol [99][151][100]), derivados fluorescentes del colesterol (NBD-colesterol [152][135][150], Pyr-colesterol [135]) y colesterol marcado radioactivamente (3H-colesterol [100], 14C-colesterol [153]) (Tabla I). La afinidad de las SCP2 por esteroides varía en función de la concentración del lípido y en función del solvente [135].

1.1.b. Ácidos grasos

Los primeros estudios de unión de ácidos grasos a SCP2 de rata y de gallina mostraron una unión muy débil o nula [154][153]. Una década más tarde se determinó que las condiciones del medio, como el agregado de etanol o el cambio de pH, afectan significativamente la afinidad de las SCP2 por los ácidos grasos [134][135][97]. La unión de ácidos grasos a las SCP2 fue determinada utilizando NBD-esteárico ([134]), ácido *cis*-parinárico ([134][96][97][132][155]), ácido *trans*-parinárico ([96][132]), Pyr-C12 ([155] [56]), ácido oleico y linoléico ([150]) y ácido fitánico y pristánico ([56]) (Tabla II). Los resultados obtenidos muestran el siguiente orden de afinidad de las SCP2 en función de las propiedades de la cadena de los ácidos grasos: ácidos grasos poli-insaturados > mono-insaturados / saturados > isoprenoides de cadena ramificada > ácidos grasos derivados de

fitol con cadena ramificada [96][156][155].

Tabla I. Constantes de afinidad de distintas SCP2 por esteroides.

Unión de esteroides a SCP2 humana madura (hSCP2) o biotinilada (bio-hSCP2), de *Toxoplasma gondii* (tgSCP2) y de rata (rSCP2). El significado de las abreviaturas es NBD: 4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol, Pyr: grupo pireno, FRET: fluorescencia por transferencia de energía, Comp: competición con ligandos, SPR: resonancia de plasmones de superficie. Referencias: 1:[98]; 2:[99]; 3:[100]; 4:[56]; 5:[152]; 6:[135]; 7:[150]; 8:[151]; 9:[71].

Esterol	SCP2	Método	K_D (μ M)	Referencia
colestatrienol	rSCP2	Dispersión de luz	0.57	1
dehidroergosterol	rSCP2	Dispersión de luz	1.2 ± 0.2	2
	rSCP2	FRET	2.7 ± 0.9	2
	rSCP2	Fluorescencia	1.3	2
[3 H]colesterol	hSCP2	Lipidex 1000	0.31 ± 0.05	3
dehidroergosterol	hSCP2	Fluorescencia	1.7 ± 0.7	3
colesterol	rSCP2	Comp. FRET	2.6 ± 0.5	4
NBD-colesterol	hSCP2	Fluorescencia	0.004 ± 0.001	5
NBD-colesterol	hSCP2	Fluorescencia	0.112 ± 0.007	6
Pyr-colesterol	hSCP2	Fluorescencia	0.124 ± 0.017	6
NBD-colesterol	bio-hSCP2	Fluorescencia	0.032 ± 0.006	7
NBD-colesterol	bio-hSCP2	SPR	0.038 ± 0.001	7
colesterol	bio-hSCP2	SPR	0.028 ± 0.020	7
dehidroergosterol	rSCP2	Combinado	0.88	8
NBD-colesterol	tgSCP2	Fluorescencia	1.01 ± 0.12	9

1.1.c. Ésteres de CoA

La capacidad de SCP2 para unir derivados de ácidos grasos esterificados con coenzima A (acil-CoA) fue descubierta poco después de detectar la unión de ácidos grasos [96]. La afinidad de las SCP2 por los acil-CoA es 40-200 veces mayor que para los ácidos grasos y los esteroides (Tabla III) [96][157], esto puede deberse a que estos lípidos son los verdaderos sustratos de la β -oxidación de ácidos grasos.

La especificidad de las SCP2 por el tipo de cadena de los acil-CoA es opuesta a la reportada para ácidos grasos (Tabla III), siendo mayor para los ligandos que presentan cadenas lineales [96]. Además, la afinidad de las SCP2 es mayor para los acil-CoA derivados de ácidos grasos saturados con 10-18 carbonos y derivados de ácidos grasos insaturados de 14-22 carbonos [96][155]. Estos resultados indican que el rango de unión de acil-CoA saturados es pequeño y que la afinidad aumenta con el grado de insaturación. Finalmente, las constantes de unión de acil-CoA derivados de ácidos grasos ramificados

(fitanoil-CoA y pristanoil-CoA) indican una mayor afinidad por fitanoil-CoA (Tabla III) [56].

Tabla II. Constantes de afinidad de distintas SCP2 por ácidos grasos.

Unión de ácidos grasos a SCP2 humana con pre-secuencia (pre-hSCP2), madura (hSCP2) o biotinilada (bio- hSCP2), bovina (bSCP2) y de rata (rSCP2). *Condiciones diferentes a las utilizadas normalmente: buffer acuoso de pH ~ 7. El significado de las abreviaturas es FRET: fluorescencia por transferencia de energía, Comp: competición con ligandos. Referencias: 1:[134]; 2:[96]; 3:[97]; 4:[56]; 5:[155]; 6:[132]; 7:[150].

Ácido graso	SCP2	Método	Condiciones *	K_D (μ M)	Referencia
NBD- esteárico	hSCP2	Fluorescencia		0.234 ± 0.047	1
NBD- esteárico	hSCP2	Fluorescencia	200mM etanol	$0.36 \pm 0.03^*$	1
RdB- esteárico	hSCP2	Fluorescencia		0.259 ± 0.056	1
cis- parinárico	hSCP2	Fluorescencia		0.400 ± 0.019	1
cis- parinárico	hSCP2	Fluorescencia		0.18 ± 0.01	2
cis- parinárico	hSCP2	Fluorescencia	pH 7.0	0.65 ± 0.08	3
cis- parinárico	hSCP2	Fluorescencia	pH 5.5	0.51 ± 0.05	3
cis- parinárico	hSCP2	Fluorescencia	pH 4.5	0.16 ± 0.01	3
cis- parinárico	bSCP2	FRET	β -cyclodextrina	0.18	5
cis- parinárico	pre-hSCP2	Fluorescencia		0.36 ± 0.14	6
trans- parinárico	hSCP2	Fluorescencia		0.56 ± 0.04	2
trans- parinárico	pre-hSCP2	Fluorescencia		0.2 ± 0.14	6
				2.24 ± 0.76	6
Pyr-C12	bSCP2	FRET	β -cyclodextrina	0.24	5
Pyr-C12	rSCP2	FRET		0.67 ± 0.11	4
ácido fitánico	rSCP2	Comp. FRET		0.89 ± 0.15	4
ácido pristánico	rSCP2	Comp. FRET		0.73 ± 0.02	4
ácido oléico	bio-hSCP2	SPR		0.222 ± 0.012	7
ácido linoléico	bio-hSCP2	SPR		2.060 ± 0.170	7

1.1.d. Fosfolípidos

Inicialmente fue propuesto que las SCP2 cumplían un rol en la transferencia y el metabolismo de los fosfolípidos [158][159], aunque esta actividad fue atribuida a un mecanismo que no involucra la unión directa de fosfolípidos [160]. La unión de fosfolípidos a SCP2 fue demostrada finalmente utilizando derivados fluorescentes de los mismos (Tabla IV) [161][103][162][163][135][71]. El orden de afinidad de la unión de fosfolípidos a las SCP2 es fosfatidil colina (carga neutra) > fosfatidil inositol (una carga negativa) > fosfatidil inositolfofostato (dos cargas negativas) > fosfatidil inositol difosfato (tres cargas negativas) [162]. Estos resultados demuestran que la afinidad de las SCP2 por los fosfolípidos aumenta con la presencia de cargas negativas en el ligando, lo que podría estar relacionado con las propiedades básicas que presentan estas proteínas.

Tabla III. Constantes de afinidad de distintas SCP2 por acil-CoA.

Unión de acil-CoA a SCP2 humana madura (hSCP2), bovina (bSCP2) y de rata (rSCP2). El

significado de las abreviaturas es FRET: fluorescencia por transferencia de energía, Comp: competición con ligandos, Despl. NR: desplazamiento de rojo-Nilo, ITC: calorimetría de titulación isotérmica. Referencias: 1:[96]; 2:[56]; 3:[157].

Acil-CoA	SCP2	Método	K _D (nM)	Referencia
<i>cis</i> -parinaroil-CoA	hSCP2	Fluorescencia	4.57 ± 0.75	1
<i>trans</i> -parinaroil-CoA	hSCP2	Fluorescencia	2.76 ± 0.10	1
fitanoil-CoA	rSCP2	Comp. FRET	250 ± 47	2
pristanoil-CoA	rSCP2	Comp. FRET	760 ± 140	2
linoleoil-CoA	bSCP2	Despl. NR	339 ± 127	3
			947 ± 542	3
linoleoil-CoA	bSCP2	ITC	89 ± 30	3
			1377 ± 191	3

Tabla IV. Constantes de afinidad de distintas SCP2 por fosfolípidos.

Unión de fosfolípidos a SCP2 humana madura (hSCP2), bovina (bSCP2) y de *Toxoplasma gondii* (tgSCP2).

*Condiciones diferentes a las utilizadas normalmente: buffer acuoso de pH ~ 7. El significado de las abreviaturas es PC: fosfatidil colina, NBD: 4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol, Pyr: grupo pireno. Referencias: 1: [163]; 2:[135], 3:[71].

Fosfolípido	SCP2	Método	Condiciones *	K _D (μM)	Referencia
PamPyrGroPCho	bSCP2	Fluorescencia		46 ± 4	1
NBD-PC	hSCP2	Fluorescencia		0.110 ± 0.012	2
Pyr-PC	hSCP2	Fluorescencia		0.163 ± 0.019	2
Pyr-PC	hSCP2	Fluorescencia	25 mM etanol	0.236	2
Pyr-PC	hSCP2	Fluorescencia	50 mM etanol	0.380	2
Pyr-PC	hSCP2	Fluorescencia	100 mM etanol	0.469	2
NBD-PC	tgSCP2	Fluorescencia		0.11 ± 0.39	3

1.I.e. Otros ligandos

Las SCP2 también unen otros ligandos de naturaleza lipídica, como 1-O-Decanil-L-D-glucósido [131], colato [85], ácido lisofosfatídico, esfingomielina, ceramida, glucosilceramida, galactosilceramida, lactosilceramida, globósidos y gangliosidos [164].

1.II. Transferencia de lípidos mediada por SCP2

La actividad de transferencia de lípidos entre membranas mediada por SCP2 fue en sus orígenes la habilidad que llevó al descubrimiento de esta proteína. La transferencia de

lípidos entre membranas mediada por SCP2 ha sido estudiada mayormente para esteroides [158][130][99][160][162][165][166][167][168][169][150] y fosfolípidos [158][159][161][160][16][170][47][168][171][165][166].

La actividad de las SCP2 en la transferencia de lípidos implica la interacción con membranas. Los espectros de dicroísmo circular (CD) en el UV-lejano de hSCP2 en presencia de vesículas lipídicas muestran un aumento de la elipticidad molar de la proteína [172]. Este cambio depende del tamaño, la curvatura y la naturaleza lipídica de las vesículas, siendo significativo para vesículas pequeñas, altamente curvadas y con carga negativa. Además del aumento del contenido de hélices- α [172][126], la unión de SCP2 a membranas produce un aumento del tiempo de correlación rotacional de la proteína [103] y un aumento de la presión superficial de membranas [168]. Todos estos estudios confirman que SCP2 interacciona con membranas para llevar a cabo su actividad en la transferencia de lípidos entre membranas.

1.III. Relación estructura-función

La función de las SCP2 depende de ciertas características estructurales, como el sitio de unión de ligandos y el sitio de interacción con membranas. Estas características son importantes para develar el mecanismo funcional de las SCP2, por lo que han sido realizados muchos estudios de los motivos estructurales implicados en la unión de ligandos y en la interacción con membranas. Sin embargo, ninguno de estos trabajos presenta resultados para SCP2 de microorganismos, sino que son en su mayoría para SCP2 de mamíferos.

El sitio de unión de ligandos de SCP2 consiste en una cavidad hidrofóbica con forma de "L", la cual puede acomodar diferentes ligandos (incluso varios) en diferentes posiciones [83] [89][90][94]. El efecto de la unión de ligandos sobre la estructura de SCP2 ha sido estudiado mediante una gran variedad de técnicas (espectroscopia de CD, fluorescencia y RMN) [95].

El sitio de unión de colesterol a SCP2 humana (hSCP2) se encuentra muy cercano al triptofano-50 (13.7 Å) [99] y está formado al menos por los residuos de la hebra- β 2 [101]. La unión de colesterol a hSCP2 disminuye levemente el contenido de estructura secundaria y oculta e inmoviliza al triptofano [100].

El sitio de unión de ácidos grasos a hSCP2 se encuentra a ~ 40 Å del triptofano-50 [156] y tiene una constante dieléctrica cercana a 2 [134]. Los ácidos grasos se unen de forma rígida a SCP2 [96][155], con el grupo carboxilato expuesto en la superficie de la proteína [97]. Además, la unión de estos lípidos produce un aumento del tamaño de la proteína de un 11 %, volviéndola más elipsoidal [152], sin modificar el contenido de estructura secundaria [96]. Los residuos implicados en la unión de ácidos grasos se

encuentran mayormente en las hélices- α I y II, aunque algunos también se detectan en las hélices- α III, IV y V [83][95][90] [85].

El sitio de unión de acil-CoA está formado por los residuos de las hélices- α I y II (unión de CoA) y de las hélices- α III, IV y V (unión de la cadena hidrocarbonada) [85]. La unión de acil-CoA a hSCP2 produce alteraciones en el contenido de estructura terciaria en algunos casos [96][173] y un aumento del tiempo de correlación rotacional y del radio hidrodinámico [96][152]. La estequiometría de unión de acil-CoA es de dos sitios de unión en varios estudios [173][152].

El sitio de unión de fosfolípidos no ha sido adecuadamente caracterizado. Hasta el momento ha sido determinado que los fosfolípidos unidos a SCP2 bovina (bSCP2) presentan una movilidad restringida y rotan junto con la proteína [103].

El sitio de unión de SCP2 para otros tipos de ligandos lipídicos también ha sido caracterizado. Por ejemplo, el sitio para el ácido rojo Nilo 2-O-butírico en hSCP2 está formado por los residuos de la cara interna de las hélices- α [157].

En cuanto al estudio de la actividad de las SCP2 en la transferencia de lípidos a membranas, fue determinado que los residuos de los extremos N y C-terminales son esenciales [174]. Está postulado que el dominio de interacción con membranas de las SCP2 se encuentra en el extremo N-terminal [175]. La hélice del extremo N-terminal es anfipática, presentando una cara no polar enfrentada al sitio de unión de ligandos y una cara polar expuesta al solvente. Esta característica llevó al análisis de la interacción con membranas de péptidos con la secuencia aminoacídica de la hélice N-terminal y variantes acortadas y/o mutadas. Los péptidos muestran un aumento del contenido de estructura hélice- α en presencia de membranas sólo cuando están presentes las secuencias correspondientes a las hélices I y II (péptido 1-32) [172]. Además, el péptido 1-32 induce un desplazamiento de un 70 % de hSCP2 unida a membranas [126] y potencia la habilidad de hSCP2 en la transferencia de colesterol, aunque por sí mismo no posee esta actividad [47].

1.IV. Objetivos para la caracterización funcional de YLSCP2

La función de las SCP2 en la transferencia de lípidos implica la unión de los mismos y la interacción con membranas. Está demostrado que las SCP2 pueden unir una gran variedad de clases lipídicas con alta afinidad, presentando una alta plasticidad conformacional del sitio de unión de ligandos. Sin embargo, el mecanismo por el cual estas proteínas pueden unir diferentes ligandos todavía no ha sido develado. Por otro lado, también está demostrado que la actividad de las SCP2 depende de la interacción con membranas. De todas formas, los ensayos de interacción entre SCP2 y membranas publicados no dejan completamente en claro la verdadera identidad del sitio y del

mecanismo de interacción. Por todo esto, presentamos en este capítulo un análisis exhaustivo de la unión de ligandos y membranas a YLSCP2 y el efecto de esta unión sobre la estructura y estabilidad de la proteína con el fin de develar el mecanismo de unión.

2. Resultados

2.1. Unión de ligandos

Está postulado que la actividad de transferencia de lípidos a membranas de las SCP2 implica la unión de lípidos en la cavidad hidrofóbica y la interacción con membranas. En esta sección son presentados los ensayos que demuestran la unión de ligandos a YLSCP2. El espectro de ligandos que une YLSCP2 fue analizado utilizando representantes de las distintas clases de lípidos: ácidos grasos (ácido *cis*-parinárico y ácido palmítico), éster de ácidos grasos (palmitoil-Coenzima A), glicerolípidos (1,2-dipalmitoil-*sn*-glicerol), fosfolípidos (fosfatidil colina de huevo) y esteroides (dehidroergosterol). Además fueron utilizados lípidos fluorescentes como ligandos no biológicos (ácido 1-anilinoftaleno-8-sulfónico y merocianina-540).

2.1.a. Ácido *cis*-parinárico

El ácido *cis*-parinárico (AP) es un ácido graso natural de 18 carbonos con 4 insaturaciones (C18:4 Δ 9,11,13,15) que presenta fluorescencia debido a sus dobles enlaces conjugados (Figura 1). El rendimiento cuántico del AP aumenta cuando se encuentra en un ambiente apolar, pero la longitud de onda del máximo de emisión no cambia significativamente [176]. La fluorescencia del AP aumenta ~ 6 veces con el agregado de YLSCP2, indicando que el ligando se une a la cavidad hidrofóbica de la proteína (Figura 2).

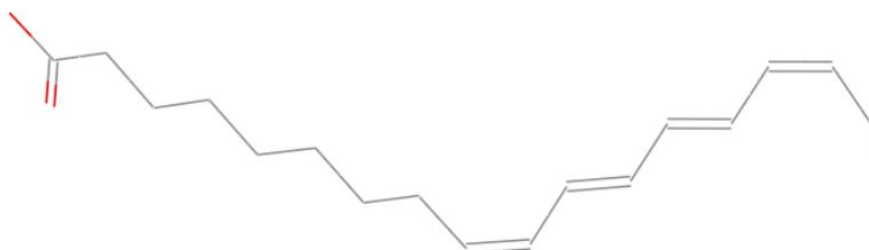


Figura 1. Estructura del ácido *cis*-parinárico (ácido *cis*-9, *trans*-11, *trans*-13, *cis*-15-octadecatetraenoico) representada con líneas. Los átomos de carbono se representan en gris y los de oxígeno en rojo.

La unión de AP a YLSCP2 fue determinada mediante una titulación seguida por

fluorescencia a 410 nm, luego de una excitación a una longitud de onda de 307 nm (Figura 2). No fueron detectadas diferencias en las titulaciones realizadas utilizando soluciones del lípido en buffer y en etanol, llegando a una concentración final de etanol menor al 2 % o 0.4 M (datos no presentados). Esto sugiere que este solvente no afecta la unión del lípido al menos en bajas concentraciones, en contraste con lo reportado para otros miembros de las SCP2 [134].

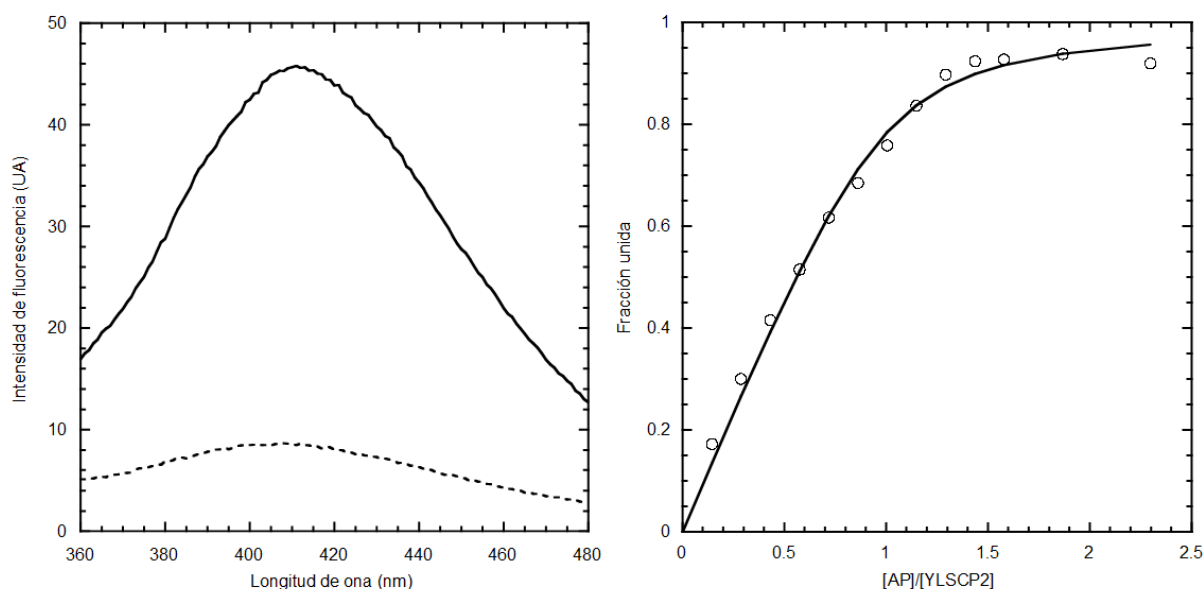


Figura 2. Espectros de fluorescencia de ácido *cis*-parinárico $\sim 2 \mu\text{M}$ en Buffer B (línea de rayas) y con el agregado de YLSCP2 $\sim 2 \mu\text{M}$ (línea negra), tomados luego de excitar a una longitud de onda de 307 nm (panel izquierdo). En el panel derecho se presenta la fracción de ácido *cis*-parinárico unido a YLSCP2 determinada experimentalmente (círculos blancos) y el ajuste del modelo de un único sitio de unión (línea).

A partir del ajuste del modelo de un sitio de unión fue obtenida una constante de afinidad de $80 \pm 40 \text{ nM}$ (promedio $\pm$ DE, $n = 2$, Figura 2, Tabla V). Este valor es un poco menor al reportado para la unión de AP a otros miembros de las SCP2 (Tabla II, [134][96][97][155] [132]), sugiriendo que YLSCP2 tiene una afinidad mayor por ácidos grasos que las SCP2 de mamíferos. Este es el primer reporte de la unión de ácidos grasos por una SCP2 perteneciente a microorganismos, ya que para POX18 (otra SCP2 de levaduras) fue reportada la ausencia de esta actividad [67].

2.1.b. Ácido palmítico

La expresión de YLSCP2 en *Yarrowia lipolytica* es inducida por la presencia de ácido palmítico (PAL) en el medio de cultivo [33]. El PAL es un ácido graso saturado de 16 carbonos (C16:0), el cual presenta una solubilidad en agua de aproximadamente 0.007 g/L (Figura 3) [177]. Por este motivo, la solución del lípido fue preparada en etanol absoluto, solvente en que la solubilidad es mucho mayor (49.3 g/L). La unión del PAL a YLSCP2 fue

determinada mediante el desplazamiento de AP, seguido por fluorescencia de AP a 410 nm (Figura 4). Durante el ensayo la concentración final de etanol nunca fue mayor al 1 %, para evitar efectos del solvente sobre YLSCP2. Los resultados muestran una disminución de la intensidad de fluorescencia del AP de ~ 50 %, sugiriendo que estos ligandos podrían compartir el mismo sitio de unión. A partir del ajuste del modelo de unión por desplazamiento de ligandos fue calculada una constante de disociación de 7 ± 6 nM (promedio $\pm$ DE, $n = 4$, Tabla V). Este valor obtenido es bastante menor a los reportados para la unión de otros ácidos grasos a miembros de las SCP2 (Tabla II). Además, estos resultados sugieren que YLSCP2 tiene mayor afinidad por los ácidos grasos saturados que por los insaturados.

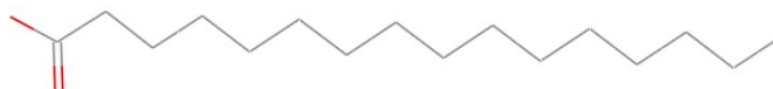


Figura 3. Estructura del ácido palmítico representada con líneas. Los átomos de carbono se representan en gris y los de oxígeno en rojo.

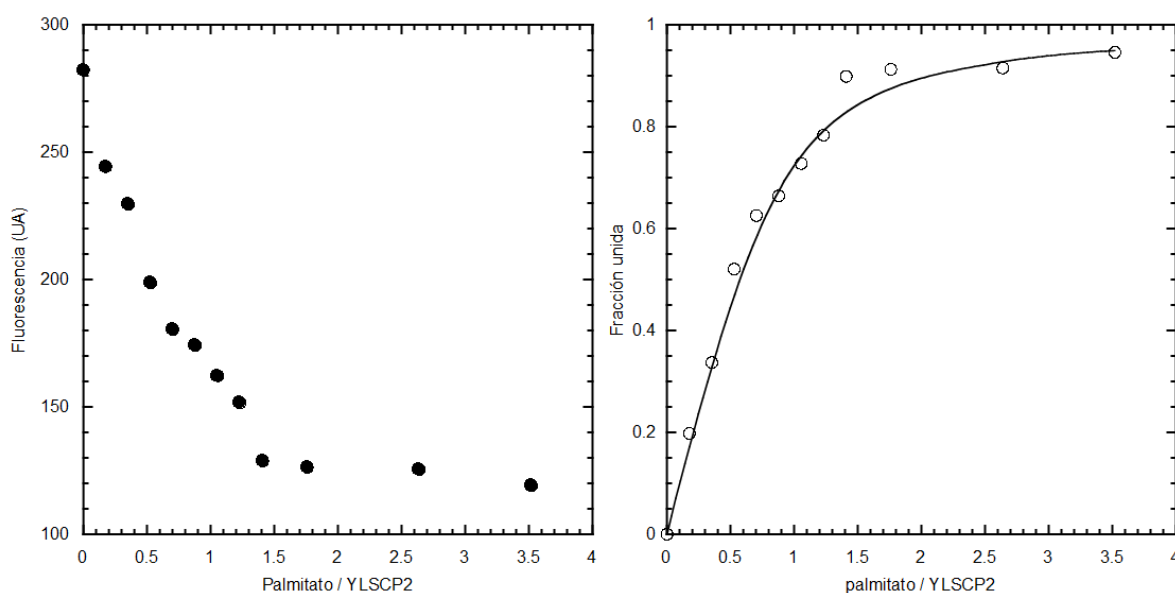


Figura 4. Desplazamiento del ácido *cis*-parinárico ~ 2 μ M unido a YLSCP2 ~ 2 μ M con ácido palmítico seguido por la intensidad de fluorescencia a 410 nm (círculos negros, panel izquierdo). En el panel derecho se muestra la fracción de ácido palmítico unido a YLSCP2 (círculos blancos) y el ajuste correspondiente al modelo de un sitio único de unión (línea).

2.1.c. *Palmitoil-Coenzima A*

Uno de los primeros pasos en la degradación de los ácidos grasos es la esterificación con Coenzima A. Este proceso, produce un gradiente de concentración de ácidos grasos que favorece la incorporación de los mismos a la célula e inhibe la salida de los acil-CoA.

El palmitoil-Coenzima A (pCoA) es un derivado de ácido palmítico que tiene unido una molécula de Coenzima A, la cual está formada por 3'-fosfo-AMP unido al ácido pantoténico fosforilado (vitamina F) y todo esto unido a una cistamina (Figura 5). Las propiedades fisicoquímicas de los acil-CoA son diferentes que las del ácido graso del cual derivan. Estos compuestos anfipáticos forman asociaciones (micelas) en un medio acuoso cuando se encuentran por encima de su concentración micelar crítica (CMC). Esta formación de micelas podría interferir en los ensayos de unión de pCoA a YLSCP2. Es por esto que la CMC del pCoA fue determinada mediante fluorescencia de la sonda merocianina-540 (MC). El resultado obtenido para la CMC de pCoA (Buffer B) fue de $37.5 \pm 1.4 \mu\text{M}$ (datos no presentados), valor que está de acuerdo con otros publicados ($30\text{-}80 \mu\text{M}$) [178][179].

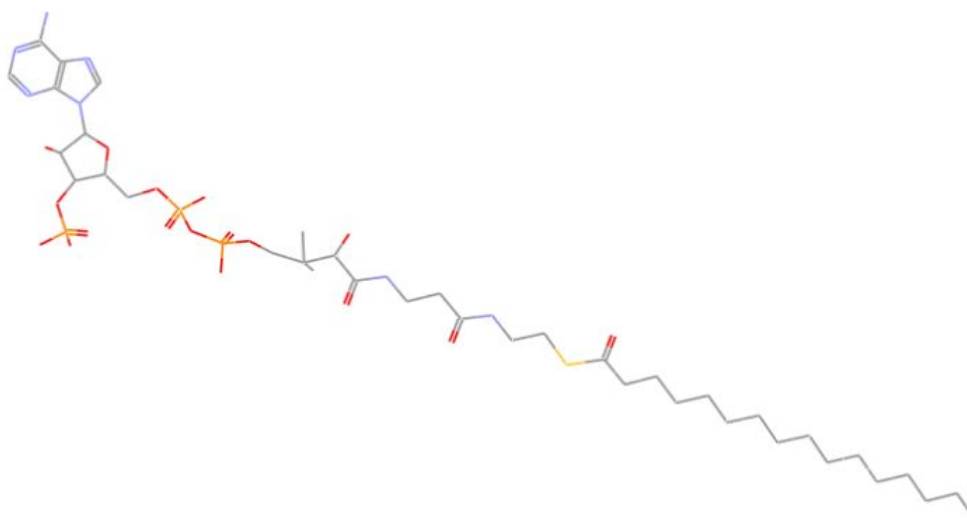


Figura 5. Estructura del palmitoil-Coenzima A representada con líneas. Los átomos de carbono se representan en gris, los de oxígeno en rojo, los de nitrógeno en azul, los de azufre en amarillo y los de fósforo en naranja.

Los ensayos de unión de pCoA a YLSCP2 fueron realizados utilizando una solución concentrada del lípido en Buffer B. En estas condiciones el pCoA se encuentra formando micelas, pero esto no presentó complicaciones durante los ensayos. La unión del lípido a YLSCP2 fue determinada mediante la atenuación de la fluorescencia del triptófano (Figura 6). Esta atenuación sugiere que el triptófano se encuentra cerca del sitio de unión de pCoA o que está censando un cambio conformacional inducido por la unión del ligando. El ajuste del modelo de un sitio de unión indica una constante de disociación de $70 \pm 30 \text{ nM}$ (promedio $\pm$ DE, $n = 3$, Tabla V). El valor obtenido es acorde a los valores publicados para la afinidad de otros miembros de las SCP2 por acil-CoA (Tabla III). Además, este valor

demuestra que YLSCP2 presenta una afinidad muy alta por los acil-CoA, la cual es similar a la obtenida para los ácidos grasos.

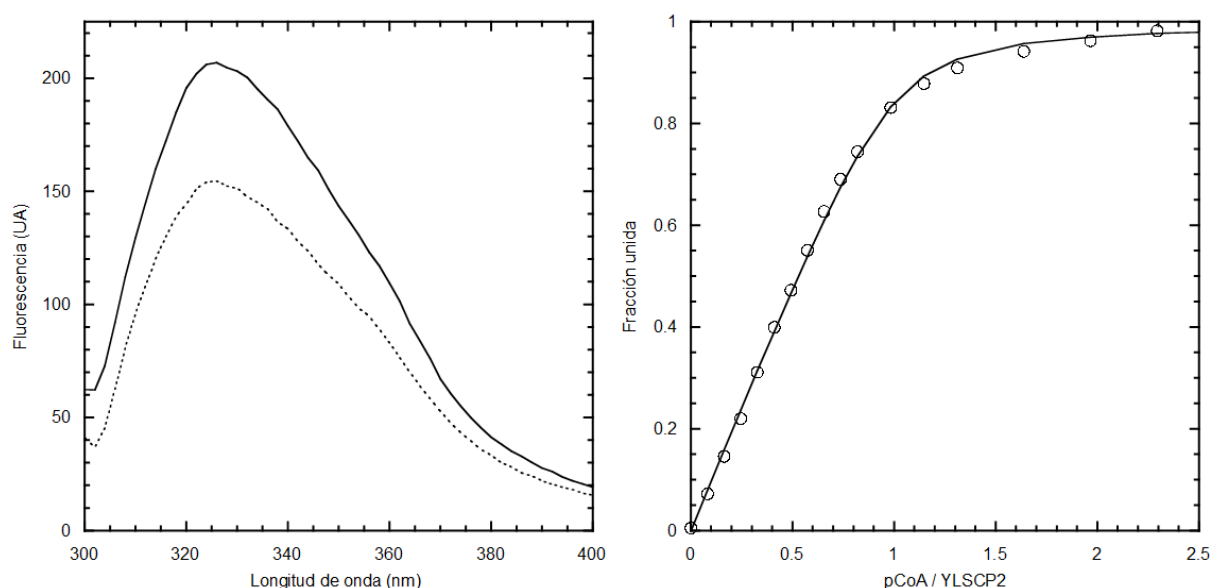


Figura 6. Espectros de fluorescencia de triptofano de YLSCP2 $\sim 5 \mu\text{M}$ sin (línea) y con palmitoil-Coenzima A (línea punteada), luego de excitar con una longitud de onda de 290 nm (panel izquierdo). En el panel derecho se muestra la fracción de palmitoil-Coenzima A unido a YLSCP2 (círculos blancos) y el respectivo ajuste a un modelo de un sitio de unión (línea).

2.1.d. 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicerol

El 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicerol (DPG) es un diacilglicerol formado por dos moléculas de ácido palmítico unidas al glicerol por enlaces éster (Figura 7). El DPG es poco soluble en agua (0.25 g/L), por lo que la solución de trabajo fue preparada en etanol donde el lípido tiene una solubilidad de ~ 20 g/L. Nuevamente, la concentración de etanol durante el ensayo no fue mayor al 1 % para evitar cambios estructurales en la proteína. La unión de DPG a YLSCP2 fue determinada mediante desplazamiento de AP, siguiendo la fluorescencia a 410 nm. Los resultados obtenidos muestran una disminución de la intensidad de fluorescencia del AP, indicando que el ácido graso fue desplazado del sitio de unión de YLSCP2 (Figura 8). Sin embargo, el ajuste del modelo de desplazamiento de ligandos que se une a un único sitio no es satisfactorio (datos no presentados), sugiriendo que el DPG se une a SCP2 siguiendo otro mecanismo. De todas formas, la afinidad (K_i) fue estimada a partir de la concentración de DPG que desplaza un 50 % de AP (IC_{50}). El valor obtenido para K_i es de 39 nM ($n = 1$, Tabla V), el cual es el primer reporte de la afinidad de un miembro de las SCP2 por un diacilglicerol, ampliando así el espectro de ligandos de esta familia de proteínas.



Figura 7. Estructura del 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicerol representada con líneas. Los átomos de carbono se representan en gris y los de oxígeno en rojo.

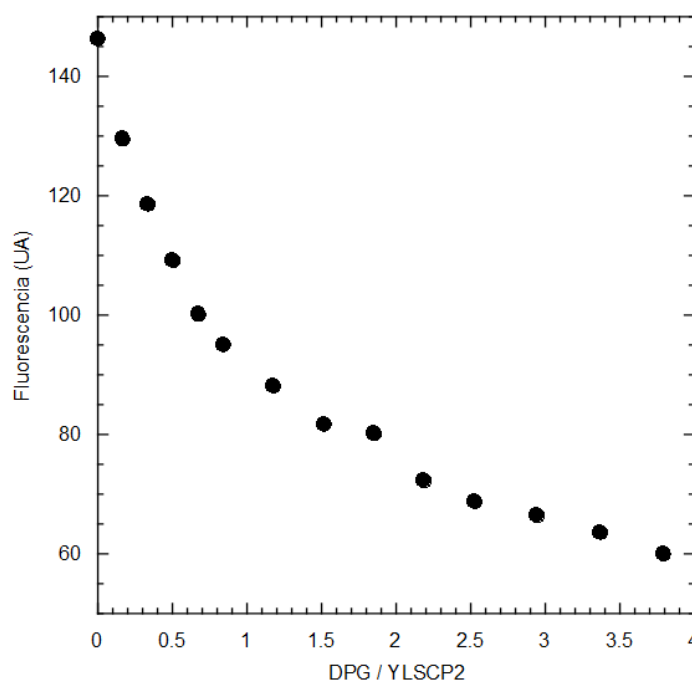


Figura 8. Desplazamiento de ácido *cis*-parinárico $\sim 2 \mu\text{M}$ unido a YLSCP2 $\sim 2 \mu\text{M}$ con 1,2-dipalmitoil-*sn*- glicerol seguido por la intensidad de fluorescencia a 410 nm (círculos negros).

2.1.e. Fosfatidil colina de huevo

La fosfatidil colina de huevo (EPC) es un glicerofosfolípido formado por dos ácidos grasos (C16:0 y C18:1 $\Delta 9$) y un grupo fosfato unidos al glicerol, con una molécula de colina unida al grupo fosfato (Figura 9). La colina tiene un pKa cerca de 13.9, por lo que la cabeza del EPC es un grupo polar que posee un carácter zwitteriónico en todo el rango de pH. Por este motivo, este fosfolípido es ampliamente utilizado como componente de vesículas lipídicas. Los ensayos de unión de EPC a YLSCP2 fueron realizados mediante desplazamiento de AP, siguiendo la intensidad de fluorescencia del AP a 410 nm (Figura 10). Los resultados indican que el EPC se une a YLSCP2 liberando el AP unido, pero el ajuste del modelo de desplazamiento de ligandos para un único sitio de unión no es bueno

(datos no presentados). Esto sugiere que el EPC se une a más de un sitio en YLSCP2 o que el sitio de unión de AP y EPC no es exactamente el mismo. La afinidad de YLSCP2 por EPC fue estimada calculando K_i a partir de la concentración de ligando necesaria para desplazar el 50 % de AP (IC_{50}). El valor obtenido para K_i es 32 nM ($n = 1$, Tabla V), el que está de acuerdo con los reportados para la unión de fosfolípidos a otros miembros de las SCP2 [163][135] [71].



Figura 9. Estructura de la fosfatidil colina de huevo representada con líneas. Los átomos de carbono se representan en gris, los de oxígeno en rojo, los de nitrógeno en azul, los de azufre en amarillo y los de fósforo en naranja.

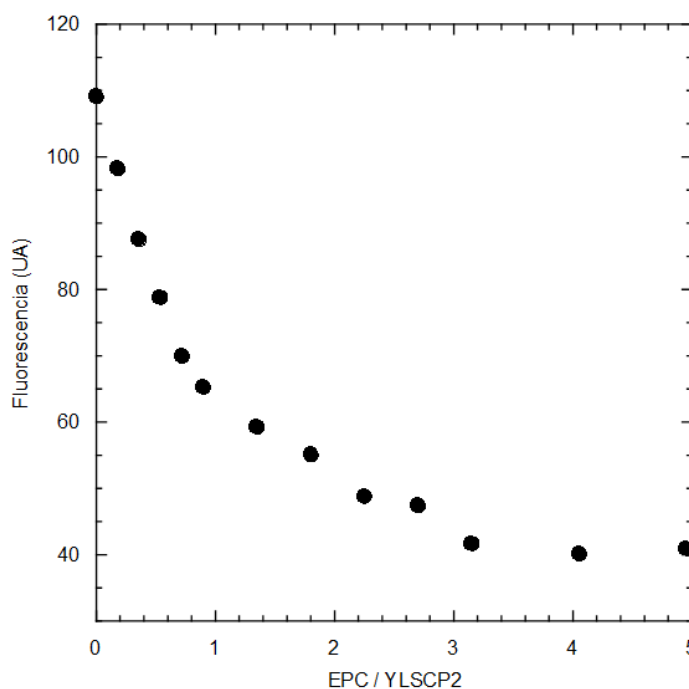


Figura 10. Desplazamiento de ácido *cis*-parinárico $\sim 2 \mu\text{M}$ unido a YLSCP2 $\sim 2 \mu\text{M}$ con fosfatidil colina de huevo seguido por la intensidad de fluorescencia a 410 nm (círculos negros).

2.1.f. Dehidroergosterol

El dehidroergosterol (DHE) es un esteroide natural que presenta fluorescencia intrínseca (Figura 11). Este compuesto fue seleccionado como representante de los

esteroles por sus características espectroscópicas. Los espectros de fluorescencia del DHE en etanol y en medio acuoso son diferentes, debido a que el DHE forma micelas en soluciones acuosas (concentración micelar crítica de ~ 25 nM). Esto complica el estudio de la unión de DHE a YLSCP2, debido a que el ligando presenta señal aunque no se encuentre interaccionando con la proteína. Fue por esto que los ensayos de unión de DHE a YLSCP2 fueron realizados mediante el análisis de los cambios de la anisotropía de fluorescencia del ligando o de la proteína. La anisotropía de fluorescencia depende del volumen del fluoróforo (o de la molécula a la cual se halla adosado el fluoróforo) y de parámetros como el tiempo de vida de fluorescencia y la viscosidad del medio. Es por esto que esta técnica es de gran utilidad para detectar la interacción entre moléculas debido a la alta sensibilidad a cambios de volumen.

Los valores de anisotropía de fluorescencia de DHE y/o YLSCP2 obtenidos muestran cambios que sugieren la interacción entre DHE y YLSCP2 (Figura 12). A partir del ajuste de un modelo de un sitio de unión se obtuvo una constante de disociación de 5.1 ± 7.7 μ M (promedio $\pm$ DE, $n = 3$, Tabla V). Este resultado está de acuerdo con los publicados para la unión de esteroides a otros miembros de las SCP2.

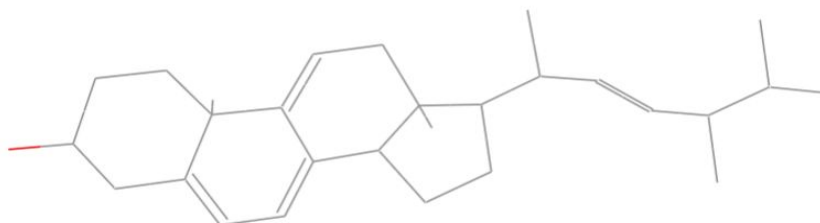


Figura 11. Estructura del dehidroergosterol representada con líneas. Los átomos de carbono se representan en gris y los de oxígeno en rojo.

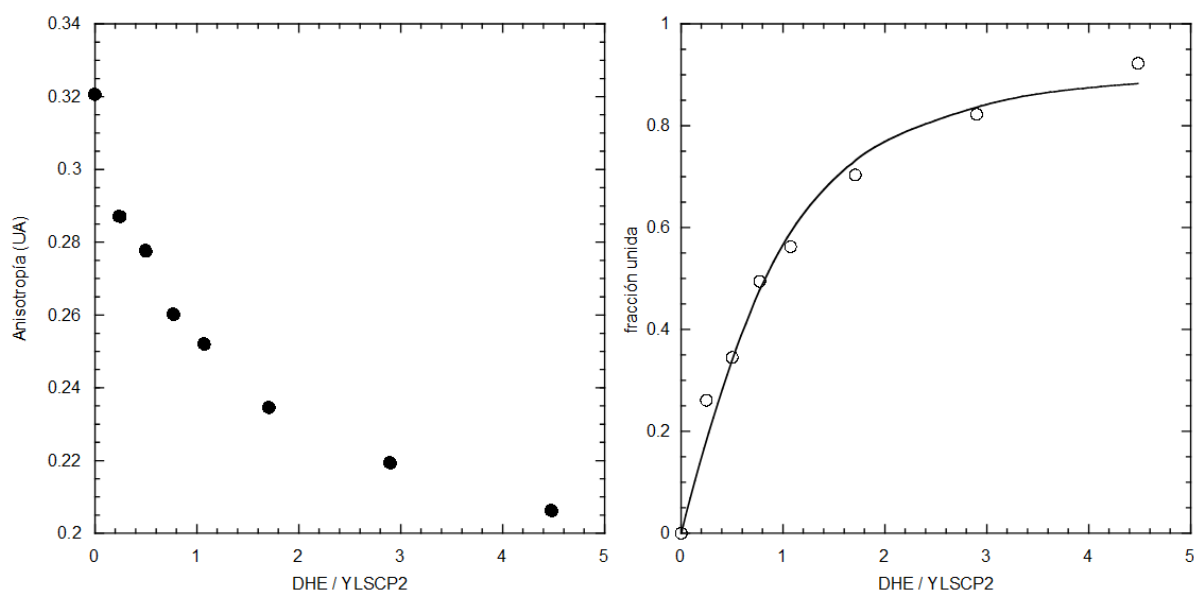


Figura 12. Unión de dehidroergosterol $\sim 8 \mu\text{M}$ a YLSCP2 seguida por anisotropía de fluorescencia luego de excitar a una longitud de de 300 nm (círculos negros). En el panel derecho se muestra la fracción de DHE unida a YLSCP2 (círculos blancos) y el ajuste correspondiente a un modelo de un sitio de unión (línea).

2.1.g. Ácido 1- anilinaftalen- 8- sulfónico

El ácido 1-anilinaftalen-8-sulfónico (ANS) es un lípido compuesto por un anillo naftol modificado con un grupo anilino y un grupo sulfónico (Figura 13). Este lípido es soluble en agua y aumenta su emisión de fluorescencia cuando se encuentra en un medio no polar, con un cambio en la longitud de onda del máximo de emisión. Estas características son el motivo por el cual el ANS es utilizado como sonda para el estudio de proteínas que unen lípidos, en la caracterización de membranas lipídicas y en los estudios de intermediarios del plegado proteico.

La titulación de YLSCP2 sobre ANS produce un aumento de intensidad y un cambio del máximo de emisión de 530 a 480 nm en la fluorescencia del ligando (Figura 14). El ajuste de las ecuaciones correspondientes a un sitio de unión a los datos de fluorescencia (Figura 6) arroja una constante $40 \pm 12 \mu\text{M}$ (promedio $\pm$ desvío estándar, $n = 4$). De todas formas, el aumento del rendimiento cuántico y el desplazamiento de la longitud de onda del máximo de emisión del ANS cuando se une a YLSCP2 son relativamente bajos. La unión del ANS en un bolsillo hidrofóbico típico produce un aumento de ~ 100 veces en la intensidad de emisión de fluorescencia y el máximo de emisión se corre a una longitud de onda de 470 nm [180]. Esto sugiere que nuestros resultados no son suficientes para asegurar que el ANS se une a la cavidad hidrofóbica de YLSCP2. Es posible que la unión de este ligando a la proteína se deba a una interacción electrostática entre el grupo sulfónico del ANS y la superficie con alto potencial electrostático positivo observada en la

estructura modelo de YLSCP2. Este tipo de interacción entre el ANS y otras proteínas ha sido reportado anteriormente [181][182].

Figura 13. Estructura del ANS representada con líneas (arriba). Los átomos de carbono se representan en gris, los de oxígeno en rojo, los de nitrógeno en azul y el de azufre en amarillo.

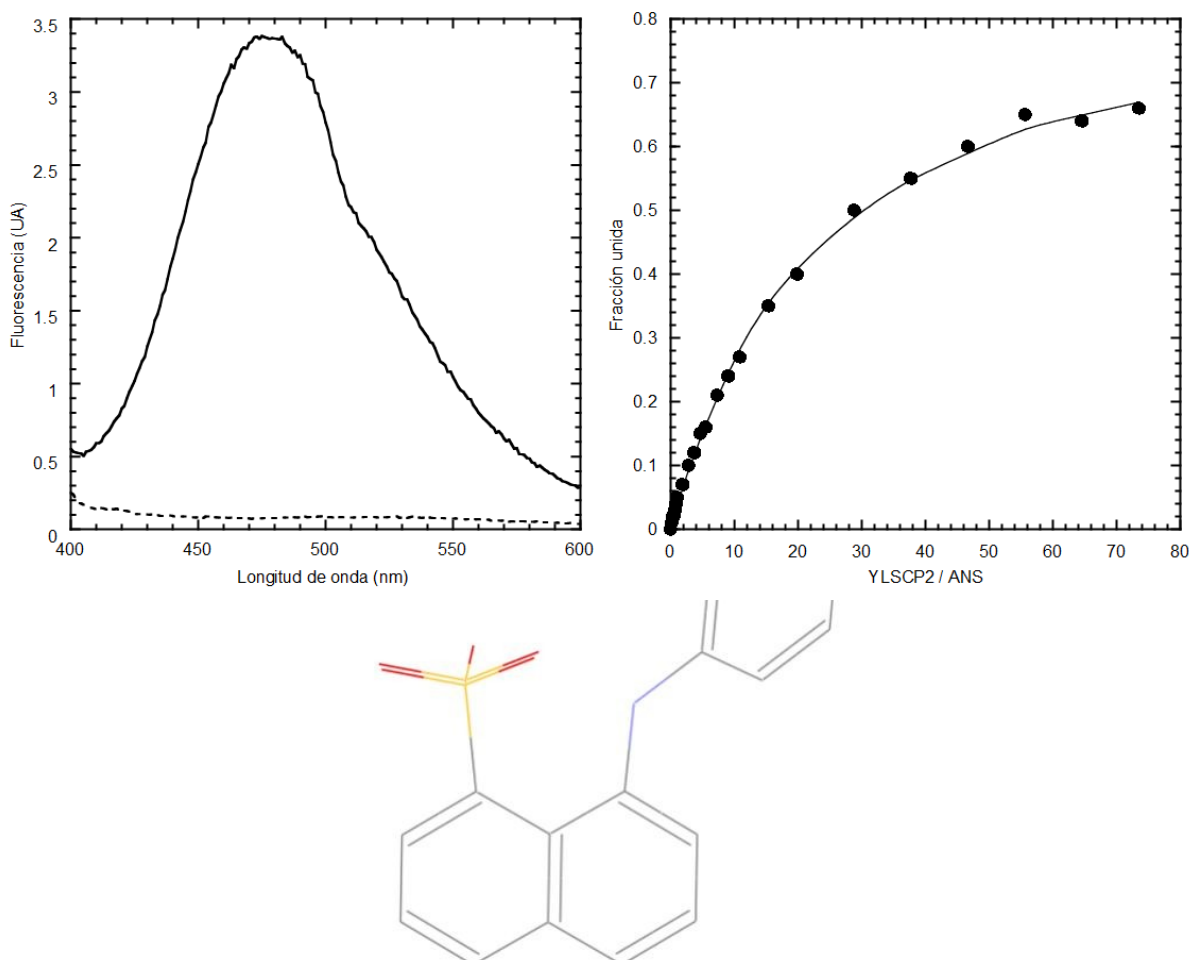


Figura 14. Espectros de fluorescencia de ANS ~ 2 μM en complejo con YLSCP2 (línea negra) y de YLSCP2 ~ 5 μM (línea punteada), luego de una excitación a una longitud de onda de 290 nm (panel izquierdo). El ajuste del modelo de un sitio de unión a la intensidad a 480 nm se presenta en el panel derecho, mostrando la fracción de ANS unida a YLSCP2 (círculos negros) y el ajuste correspondiente (línea).

Para obtener mayor información termodinámica del proceso de unión de ANS a YLSCP2 fue realizado un ensayo de calorimetría de titulación isotérmica (ITC). La titulación progresiva de YLSCP2 sobre una solución de ANS ~ 10 μM produce una liberación de calor (Figura 15). Los controles de dilución del ANS y de la proteína muestran que no se producen reacciones que interfieran en el proceso de unión (Figura 15, inserto). A partir del ajuste del modelo de unión a n sitios independientes fueron obtenidos los parámetros termodinámicos que se presentan en la Tabla VI (Figura 16). La constante de afinidad obtenida fue de 630 ± 70 nM (Tabla V), con un número de sitios ocupados igual a

0.9 ± 0.2 (promedio $\pm$ DE, $n = 2$). Este valor es mucho menor que el obtenido para la constante de disociación mediante emisión de fluorescencia de ANS. Diferencias como esta han sido reportadas entre las constantes obtenidas por ITC y métodos experimentales [183].

Es probable que el ANS se una con alta afinidad a YLSCP2 en un sitio que no es detectado mediante emisión de fluorescencia del ligando, lo que sugiere que ese sitio se encuentra expuesto al solvente. Además, si la unión de ANS a YLSCP2 es de tipo electrostática, el sitio de unión podría ser la zona con alto potencial electrostático positivo de la proteína. Según el modelo tridimensional de YLSCP2 el sitio de dimerización se encuentra cerca de la zona cargada positivamente. Entonces, es probable que cuando la proteína dimeriza, el sitio donde se une el ANS se oculta del solvente y el ligando presenta fluorescencia. Si esto es así, la constante de unión de ANS a YLSCP2 obtenida por fluorescencia estaría relacionada con la constante de dimerización de la proteína.

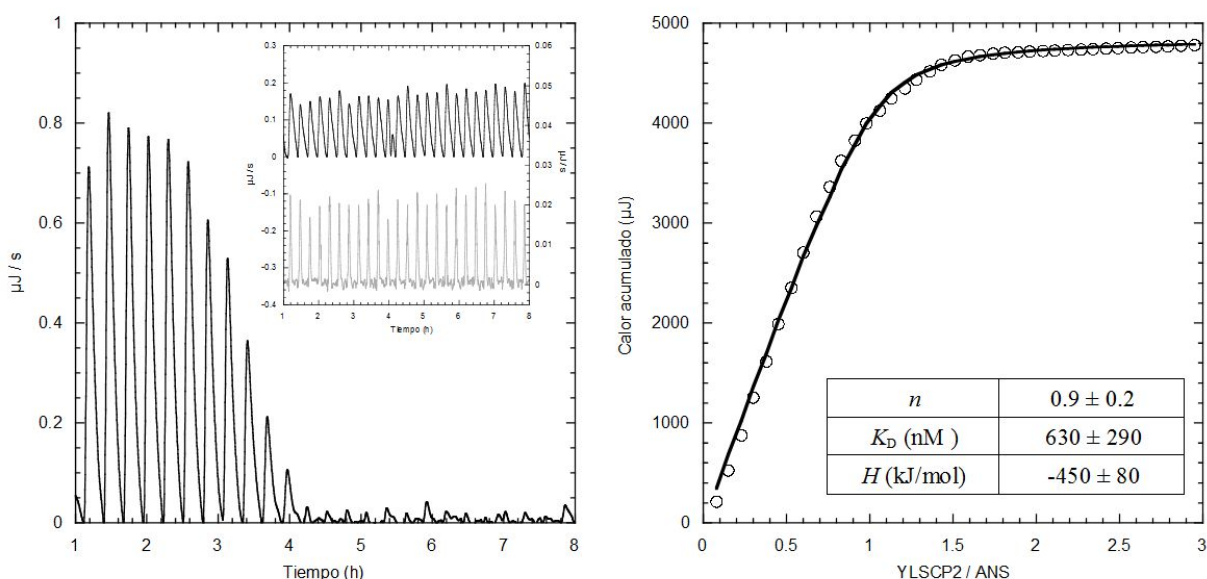


Figura 15. Unión de ANS a YLSCP2 seguida por ITC. A partir del calor liberado durante el agregado de YLSCP2 sobre ANS $\sim 10 \mu\text{M}$ (línea negra, panel izquierdo) se obtuvo el calor acumulado (círculos blancos, panel derecho). Los controles realizados (inserto, panel izquierdo) fueron la titulación de YLSCP2 sobre Buffer B (línea gris, eje derecho) y la titulación de Buffer B sobre ANS (línea negra, eje izquierdo). A partir del ajuste de un modelo de n sitios independientes (línea, panel derecho) a los valores de calor acumulado (círculos blancos) fueron obtenidos los parámetros termodinámicos de la unión (inserto).

2.1.h. Merocianina-540

La merocianina-540 (MC) es un lípido fluorescente ampliamente utilizado como sonda para el estudio de membranas lipídicas (Figura 16). En un principio, este compuesto fue utilizado como sonda en la determinación de la concentración micelar crítica (CMC) del palmitoil-Coenzima A. El ensayo de unión de MC a YLSCP2 fue estudiado como control

para un análisis de los posibles cambios en la CMC debido a la interacción entre el ligando y la proteína. Sin embargo, los resultados obtenidos muestran cambios en la fluorescencia de MC en presencia de YLSCP2 (Figura 17). A partir del ajuste del modelo de un sitio de unión para MC a YLSCP2, usando el centro de masa y la longitud de onda del máximo de emisión, fue obtenida una constante de disociación de 700 ± 500 nM ($n = 1$, Tabla V).

Figura 16. Estructura del merocianina-540 representada como líneas (arriba). Los átomos de carbono se representan en gris, los de oxígeno en rojo, los de nitrógeno en azul y los de azufre en amarillo.

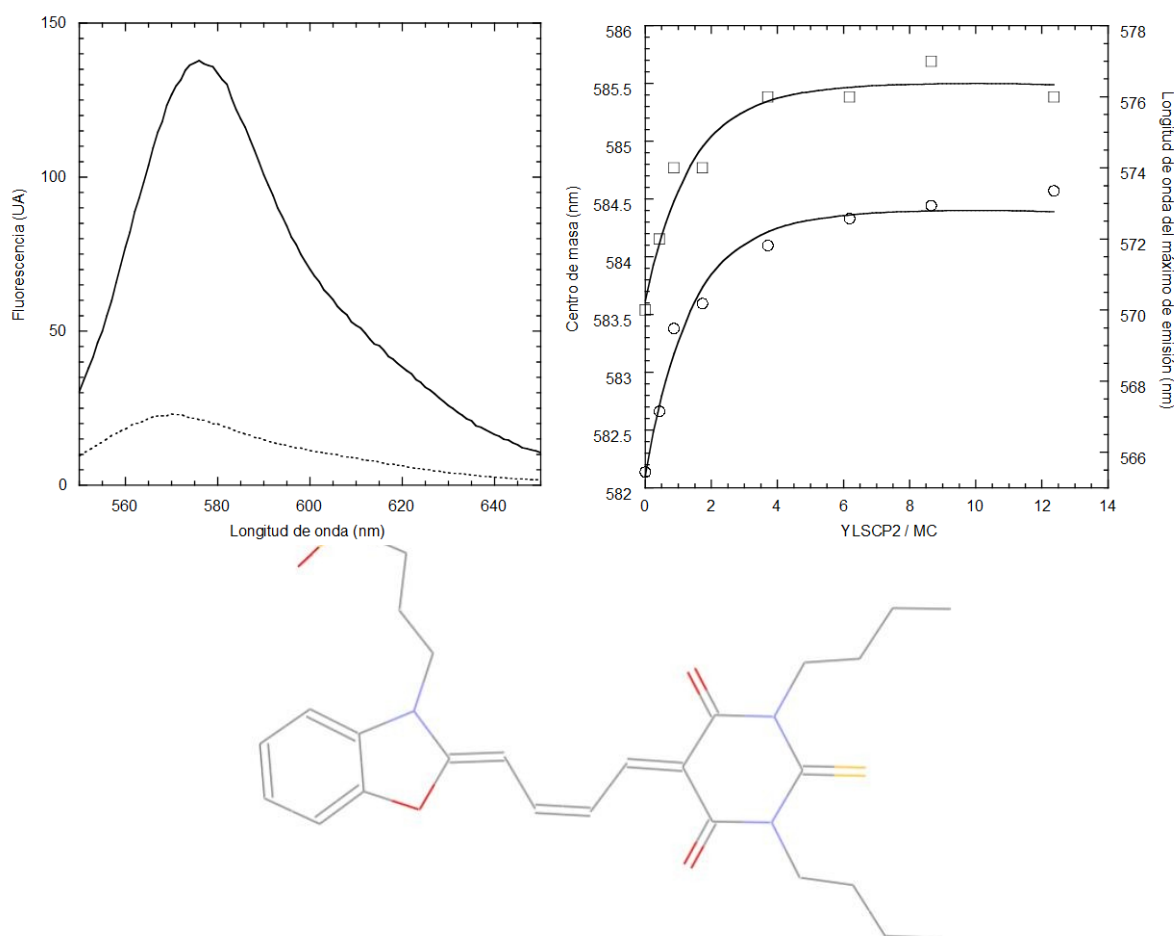


Figura 17. Espectros de fluorescencia de merocianina-540 ~ 1 μ M sola (línea punteada) y con el agregado de YLSCP2 (línea negra), utilizando una longitud de onda de excitación de 530 nm (panel izquierdo). Ajuste de un modelo de un sitio unión (línea) al centro de masa de los espectros de fluorescencia de merocianina-540 (círculos) y la longitud de onda del máximo de emisión (cuadrados) en función de YLSCP2 (panel derecho).

Tabla V. Constantes de afinidad de YLSCP2 por diferentes ligandos.

Los valores marcados con asterisco (*) son una estimación de la afinidad obtenida a partir de la IC_{50} .

Ligando	Método	K_D (nM)
ácido <i>cis</i> -parinámico	Fluorescencia del ligando	80 ± 40
ácido palmítico	Desplazamiento de <i>cis</i> -AP	7 ± 6
palmitoil-Coenzima A	Fluorescencia de YLSCP2	70 ± 30
1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicerol	Desplazamiento de <i>cis</i> -AP	$39 *$
fosfatidilcolina de huevo	Desplazamiento de <i>cis</i> -AP	$32 *$
dehidroergosterol	Anisotropía de fluorescencia	5100 ± 7700
ácido 1-anilinaftalen-8-sulfónico	Fluorescencia del ligando	40000 ± 12000
	ITC	630 ± 290
merocianina-540	Fluorescencia del ligando	700 ± 500

2.II. Interacción de YLSCP2 con membranas

En la sección anterior fue demostrado que YLSCP2 puede unir una amplia variedad de compuestos hidrofóbicos. La función de las SCP2 depende tanto de la unión de ligandos como de la interacción con membranas. En esta sección son presentados los resultados del estudio de la interacción entre YLSCP2 y membranas fosfolipídicas, utilizando vesículas de EPC 100% (SUV).

El efecto de la interacción de YLSCP2 y SUV sobre el contenido de estructura secundaria de la proteína fue analizado mediante dicroísmo circular. Los espectros de CD de YLSCP2 en el UV-lejano muestran que el agregado de SUV produce un aumento del contenido de estructura secundaria de 30 a 42 % de hélices- α y de 22 a 40 % de hoja- β (Figura 18). Los resultados reportados previamente para otros miembros de las SCP2 también muestran un aumento del contenido de estructura secundaria, aunque sólo se reportan los datos para el contenido de hélices- α [126][172][101]. El análisis de nuestros resultados sugiere que en YLSCP2 ambos elementos de estructura secundaria podrían estar involucrados en la interacción con membranas. A partir de la estructura de YLSCP2 obtenida mediante modelado por homología de YLSCP2 (36.7 % hélice- α y 17.9 % hoja- β , ver capítulo II) es evidente que un aumento de estructura de esa magnitud requiere una reorganización de gran parte de los residuos desorganizados. En el caso de hSCP2, está propuesto que el sitio de interacción con membranas se encuentra en la hélice- α del extremo N-terminal [126][172]. Los residuos desorganizados del extremo N-terminal de YLSCP2 que podrían reorganizarse no son suficientes para explicar los resultados obtenidos experimentalmente. Esto indicaría que la interacción de YLSCP2 con SUVs no

induce cambios solamente el extremo N-terminal, sino que esta interacción afecta a gran parte de la proteína.

Para conocer los efectos de la unión de membranas o micelas sobre la estructura terciaria de YLSCP2 fueron realizados espectros de CD en el UV-cercano de una muestra de la proteína y vesículas de EPC 100% (SUV) (Figura 18). Los cambios observados en el espectro se localizan mayormente entre 260-280 nm, zona donde absorben mayormente los residuos de fenilalanina. En la estructura modelo de YLSCP2 obtenida por homología podemos ver que 5 de los 6 residuos de fenilalanina forman parte de las hélices- α (Phe7 y 13: hélice- α 1, Phe42: hebra- β 1, Phe86: hélice- α 3 y Phe100: hélice- α 4). Por otro lado, el triptofano y la tirosina se ubican en la hebra- β 2 y no cambian significativamente su señal de CD en presencia de SUV. Todo esto sugiere que la interacción de YLSCP2 con SUV induce cambios en la estructura terciaria de una gran parte de la proteína, principalmente en las hélices- α .

La transferencia de lípidos entre YLSCP2 y membranas fue estudiada en colaboración con el grupo de investigación de la Dra. Córscico [125]. El mecanismo de transferencia de lípidos a membranas mediado por proteínas puede explicarse o bien como un proceso por difusión (los lípidos difunden de la proteína a la membrana) o bien como un proceso "colisional" (la proteína interacciona con la membrana para entregar el lípido). En el caso de YLSCP2 fue demostrado que la transferencia es del tipo "colisional", ya que depende de la composición y concentración de las vesículas [125]. La velocidad de transferencia de lípidos mediada por YLSCP2 aumenta casi 47 veces con la presencia de carga negativas en las vesículas (25 % de cardiolipina). Esto puede estar relacionado con las propiedades básicas de esta proteína ($pI > 8.0$), indicando que las interacciones electrostáticas serían importantes para la unión de YLSCP2 a membranas. Este resultado está de acuerdo con los publicados para otros miembros de las SCP2 ([126][172][124][101]), sugiriendo que el mecanismo de transferencia de lípidos de las SCP2 se encuentra conservado en la familia.

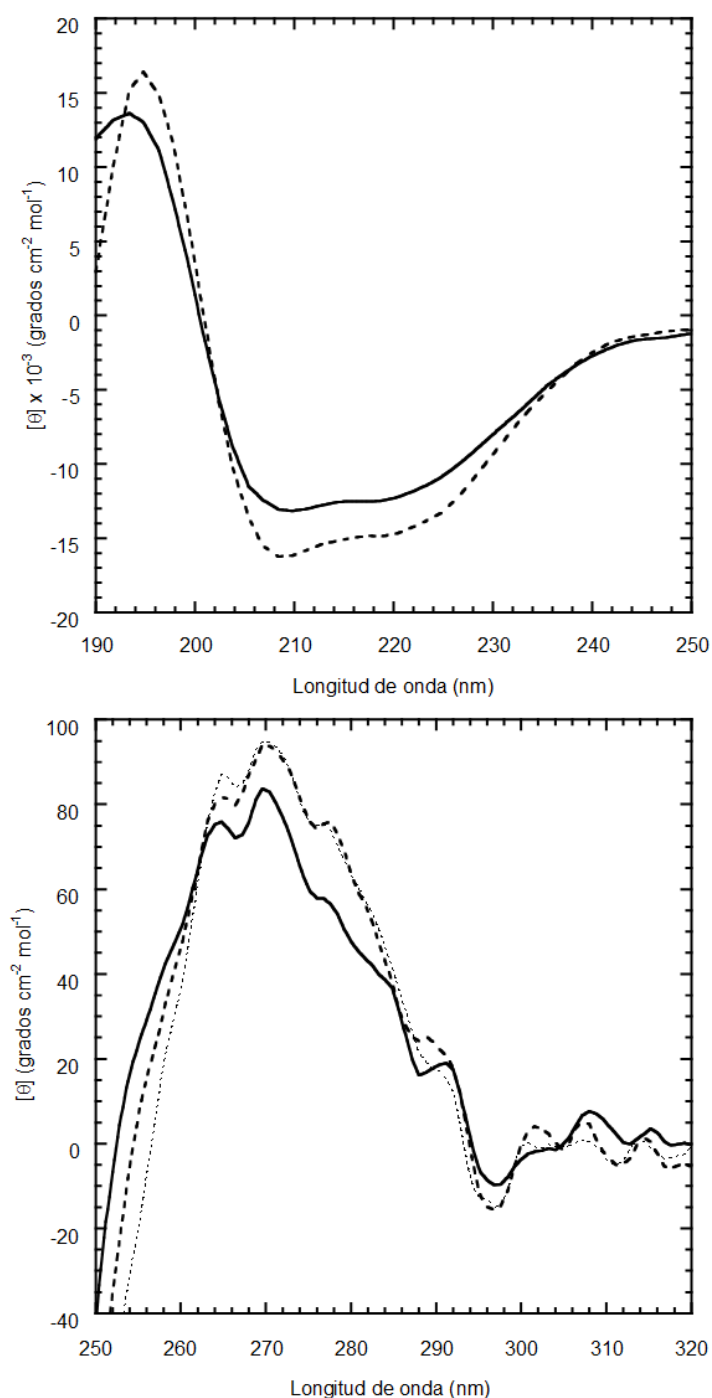


Figura 18. Espectros de dicroísmo circular de YLSCP2 sola (línea negra) y en presencia de vesículas de EPC en el UV-cercano ($\sim 15 \mu\text{M}$, panel superior) y en el UV-lejano ($\sim 5 \mu\text{M}$, panel inferior). La relación YLSCP2:EPC es 1:100 (línea de rayas, panel superior), 1:10 (línea de rayas panel inferior) y 1:20 (línea punteada, panel inferior).

En conjunto, los resultados presentados demuestran que YLSCP2 interacciona con membranas, requisito fundamental para su actividad biológica. Los cambios estructurales de YLSCP2 inducidos por SUV involucran gran parte de la proteína aumentando el contenido de estructura secundaria y terciaria. La transferencia de lípidos a membranas

mediada por YLSCP2 aumenta con la presencia de cargas negativas en las vesículas. Esto sugiere que las interacciones electrostáticas tendrían un rol preponderante en el proceso de interacción entre YLSCP2 y las membranas, lo que es muy común para este tipo de interacciones [184]. Corroborando este modelo, es de destacar que en la estructura tridimensional teórica de YLSCP2 se observa un potencial electrostático positivo cerca del extremo C-terminal que podría estar involucrado en la interacción con membranas y en la unión de lípidos. Probablemente, la interacción entre la proteína cargada con un lípido y la membrana favorezca la liberación del lípido hacia la bicapa lipídica porque algunos de los residuos que interaccionaban con el ligando pasan a interaccionar con la membrana. Este mecanismo no está completamente de acuerdo con algunos trabajos donde se postula que el sitio de interacción con membranas de las SCP2 se encuentra en la hélice- α del extremo N-terminal. Sin embargo, el mecanismo de interacción propuesto por nosotros explicaría los resultados observados del aumento de la transferencia de lípidos en función al aumento de las cargas negativas de las membranas, el cual fue determinado también para otras SCP2.

2.III. Efecto de la unión de ligandos sobre YLSCP2

Los resultados presentados hasta el momento comprueban que YLSCP2 presenta la misma capacidad de unión de ligandos e interacción con membranas que fue determinada para otros miembros de las SCP2. Sin embargo, esta información por sí sola no es suficiente para determinar el mecanismo por el cual estas proteínas pueden unir con alta afinidad ligandos tan diversos. Si bien existen varios trabajos que estudian el efecto de la unión de ligandos sobre la estructura de las SCP2, ninguno de ellos presenta un ensayo exhaustivo que incorpore todos los tipos de ligandos. Además, no existe información acerca del efecto de la unión de lípidos sobre la estabilidad de las SCP2. Por esta razón, fue analizado el efecto de la unión de ligandos en la estructura y estabilidad de YLSCP2 y los resultados se presentan a continuación.

2.III.a. Estructura secundaria

Los posibles cambios en la estructura secundaria de YLSCP2 originados por la unión de ligandos fueron estudiados mediante CD en el UV-lejano (Figura 19). El contenido de estructura secundaria de YLSCP2 disminuye levemente con la unión del AP (~ 3 % de hélice- α) y de ANS (~ 3 % de hoja- β). Esta disminución del contenido de estructura de YLSCP2 por AP difiere del reportado para la unión de ácido oléico (C18:1 Δ 9) a hSCP2, donde no se detectan cambios en el espectro de CD [96]. Por otro lado, la unión de pCoA no afecta la estructura secundaria de YLSCP2 cuando el ligando se encuentra a concentraciones menores que la CMC. Un resultado similar fue publicado para la unión de

oleoil-CoA a hSCP2 ([96]), indicando que la unión de los acil-CoA no modificaría la estructura de las SCP2. Sin embargo, la unión a YLSCP2 del pCoA a una concentración mayor que la CMC produce un aumento del contenido de estructura secundaria de ~ 8 % para las hélices- α y de ~ 8 % para las hojas- β . Este resultado podría deberse a la interacción entre YLSCP2 y las micelas, de forma similar a la observada con membranas lipídicas (ver sección 2B). Hay que destacar que la unión de CoA a hSCP2 también produce un aumento del contenido de estructura secundaria de la proteína ([96]), por lo que es necesario realizar más ensayos para determinar el origen del efecto observado en YLSCP2.

El contenido de estructura secundaria de YLSCP2 aumenta luego de la unión de PAL y EPC (~ 2 % para hélices- α y ~ 1 % para hojas- β en ambos casos). La unión de DPG a YLSCP2 produce un aumento del ~ 10 % para las hélices- α y una disminución del ~ 4 % para las hojas- β . Finalmente, el colesterol y el DHE no inducen cambios en los espectros de CD en el UV-lejano de YLSCP2 (datos no presentados), de forma similar a los datos publicados [100].

En conjunto, estos resultados sugieren que la unión de distintas clases de lípidos produce efectos diferenciales sobre el contenido de estructura secundaria de YLSCP2. En un intento de clasificar el efecto de los ligandos sobre la estructura de YLSCP2, podemos agruparlos según los efectos inducidos sobre el contenido de estructura secundaria de YLSCP2: disminución (AP y ANS), aumento (PAL y EPC), sin efectos (pCoA, DHE y colesterol) y aumento de hélices- α con disminución de hojas- β (DPG). Tentativamente podemos inferir que estos diferentes modos de acción reflejan diferencias en el sitio de unión del correspondiente ligando dentro de la cavidad de YLSCP2.

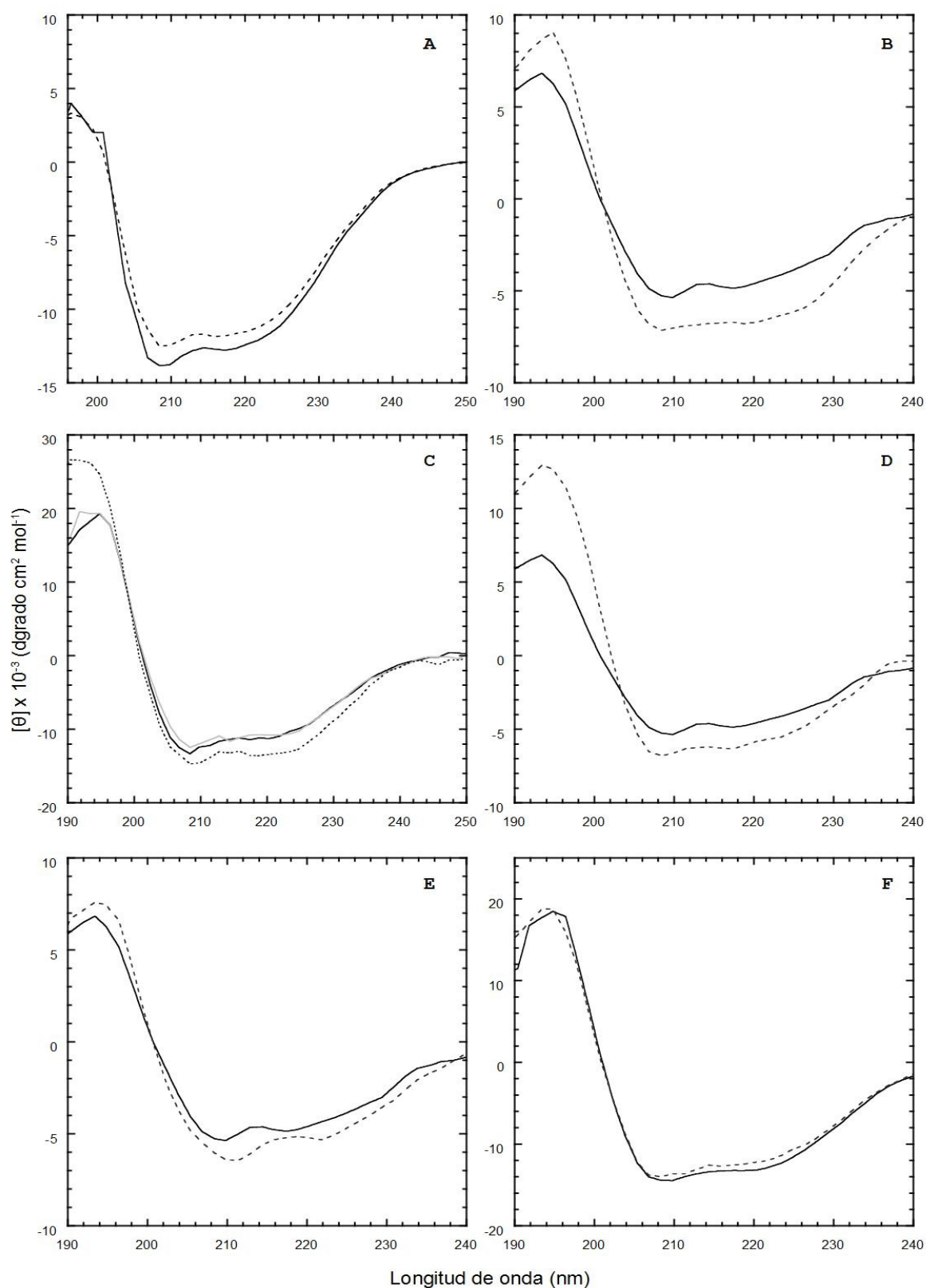


Figura 19. Espectros de CD en el UV-lejano de YLSCP2 ~ 5 μ M sola (línea negra) y en presencia de los siguientes ligandos (línea de rayas): (A) ácido *cis*-párinárico, (B) ácido palmítico, (C) palmitoil-Coenzima A (1 equivalente:gris, 3 equivalentes:rayas), (D) 1,2-dipalmitoil-sn-glicerol, (E) fosfatidil colina de huevo y (F) ácido 1-anilinoaftalen-8-sulfónico.

2.III.b. Estructura terciaria

Los cambios en la estructura terciaria de YLSCP2 inducidos por la unión de ligandos fueron estudiados mediante espectros de CD en el UV-cercano (Figura 20). Los ligandos PAL, DPG y EPC no producen cambios significativos en el espectro de CD en el UV-cercano, así como tampoco el DHE (datos no presentados). Por otro lado, tanto el AP como el ANS inducen un aumento de la señal de elipticidad. En el caso de AP es evidente que el aumento de la señal (entre 280 y 340 nm) se debe al ligando, indicando que el mismo se une a YLSCP2 de forma rígida. Resultados similares fueron reportados para la unión de AP a albúmina [185] y a lactoglobulina [186]. En el caso de la unión de ANS el aumento de la señal se observa entre 265-290 nm, región donde absorben tanto la proteína como el ligando. Por lo tanto, no se puede asignar la señal de CD observada a cambios de la proteína o del ligando. Finalmente, la unión del pCoA a YLSCP2 produce una disminución de la señal de CD entre 260-280 nm. Sin embargo, el pCoA presenta elipticidad en el UV-cercano en la misma región donde se observan los cambios del espectro de YLSCP2 (datos no presentados). De todas formas, los espectros de YLSCP2/pCoA corregidos por la señal del ligando muestran una disminución de la señal. Esto sugiere una disminución del contenido de estructura terciaria inducida por el ligando, lo que sería consistente el hecho de que el pCoA produce atenuación de la intensidad de fluorescencia del triptofano. En resumen, nuevamente se pueden agrupar distintos tipos de ligandos según el efecto que producen en la estructura de YLSCP2, los cuales son diferentes según el tipo de lípido implicado en la unión.

Además, en el caso de los ligandos fluorescentes, también fue analizada la transferencia de energía de fluorescencia, los cambios de anisotropía de fluorescencia y el desplazamiento con ligandos no fluorescentes. El espectro de emisión de fluorescencia de triptofano de YLSCP2 se solapa con el espectro de absorbancia del AP, el ANS y el DHE. Se puede observar transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) en los espectros de fluorescencia del AP y el ANS unido a YLSCP2, pero no en los espectros de DHE (datos no presentados). Esto indicaría que dentro de la cavidad hidrofóbica de YLSCP2 los ligandos AP y ANS se ubican cerca del triptofano. Por otro lado, la anisotropía de fluorescencia de los ligandos (AP, ANS y DHE) y la proteína presentan cambios durante la interacción. Los cambios de anisotropía de fluorescencia pueden deberse a cambios del coeficiente de correlación rotacional, del tiempo de vida de fluorescencia, transferencia de la excitación entre fluoróforos, etc.

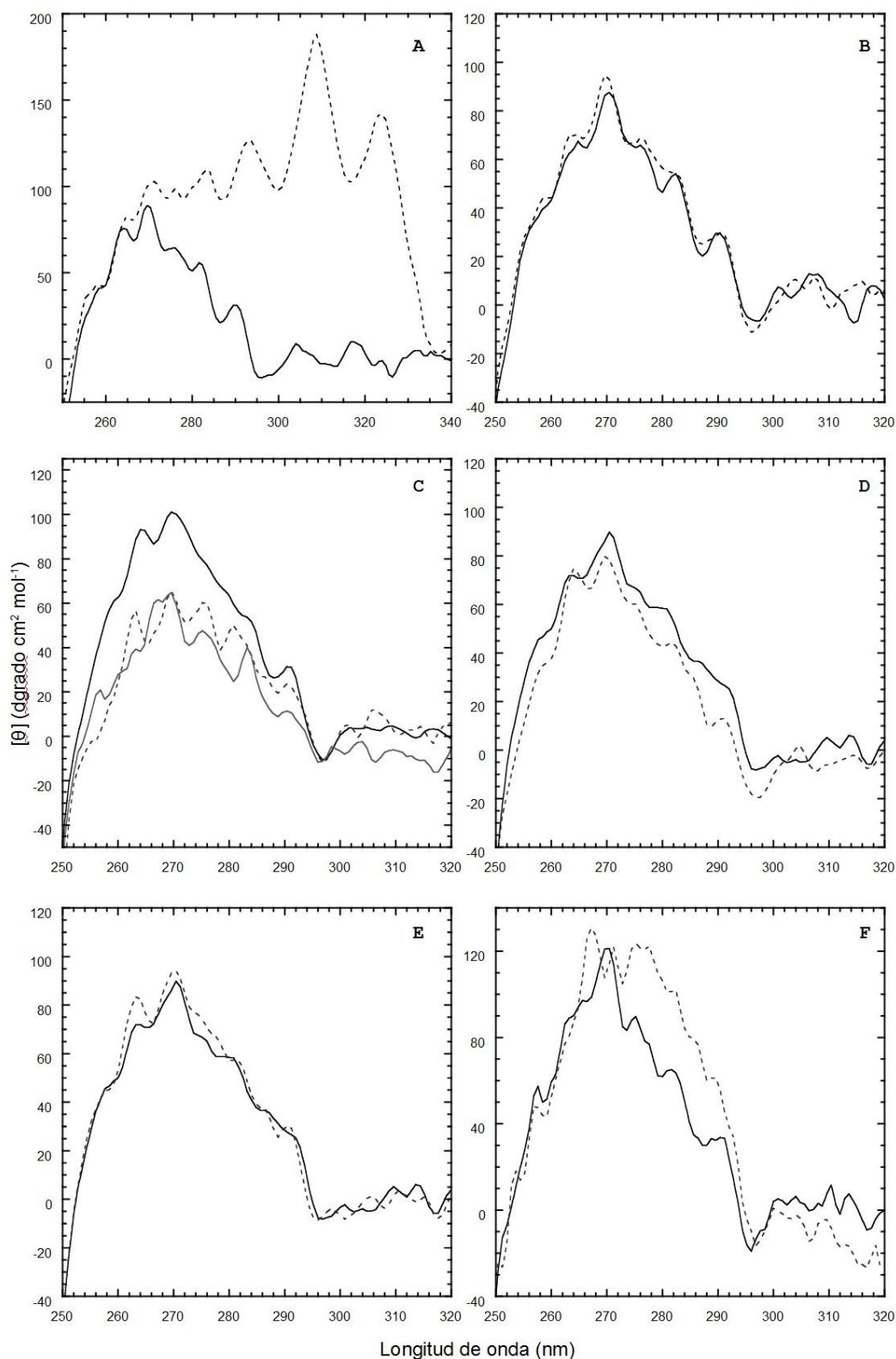


Figura 20. Espectros de CD en el UV-cercano de YLSCP2 $\sim 15 \mu\text{M}$ sola (línea negra) y en presencia de los siguientes ligandos (línea de rayas): (A) ácido *cís*-párinárico, (B) ácido palmítico, (C) palmitoil-Coenzima A (1 equivalente gris, 3 equivalentes:rayas), (D) 1,2-dipalmitoil-sn-glicerol, (E) fosfatidil colina de huevo y (F) ácido 1-anilinaftalen-8-sulfónico.

Finalmente, los ensayos de desplazamiento de AP también fueron realizados para pCoA, ANS y colesterol (datos no presentados). Los resultados demuestran que el pCoA y el ANS desplazan al AP unido a YLSCP2. Esto sugiere que los ligandos PAL, DPG, EPC, pCoA y ANS se unen al mismo sitio que el AP, o que la unión de estos ligandos produce cambios conformacionales en YLSCP2 que liberan al AP. Por otro lado, el colesterol produce un aumento de la fluorescencia del AP unido a YLSCP2, lo cual podría deberse a la unión de ambos ligandos en simultáneo o a la interacción del AP con agregados de colesterol (CMC~ 25 nM).

2.III.c. Estado de agregación

El efecto de la unión de algunos ligandos (PAL, colesterol, ANS y pCoA) sobre el estado hidrodinámico de YLSCP2 fue analizado mediante SAXS (Figura 21). Estos estudios fueron realizados para determinar si la unión de ligandos a YLSCP2 podría inducir o inhibir la oligomerización de la proteína. Los resultados previos muestran que YLSCP2 une estos ligandos con alta afinidad, pero cada uno de ellos induce cambios diferenciados en la estructura secundaria y terciaria de la proteína. El radio de giro de YLSCP2 en complejo con ligandos fue determinado mediante el análisis de la función de densidad de pares de distancias obtenida a partir de experimentos SAXS. Los resultados muestran que la unión de colesterol (COL) y ANS produce un desplazamiento del equilibrio hidrodinámico hacia la formación de monómero y dímero, la unión de PAL hacia la formación de dímero y tetrámero, y el pCoA desplaza el equilibrio hacia la formación de tetrámero (Figura 22 y Tabla VI). En todos los casos la globularidad de la proteína se mantiene estable según el análisis de los "gráficos de Kratky" (Figura 21). El resultado obtenido para el pCoA debe ser analizado cuidadosamente, ya que la concentración del lípido fue mayor a la CMC. Es posible que la proteína además de unir el ligando se encuentre interaccionando con micelas, lo que explicaría la formación de agregados de alto peso molecular.

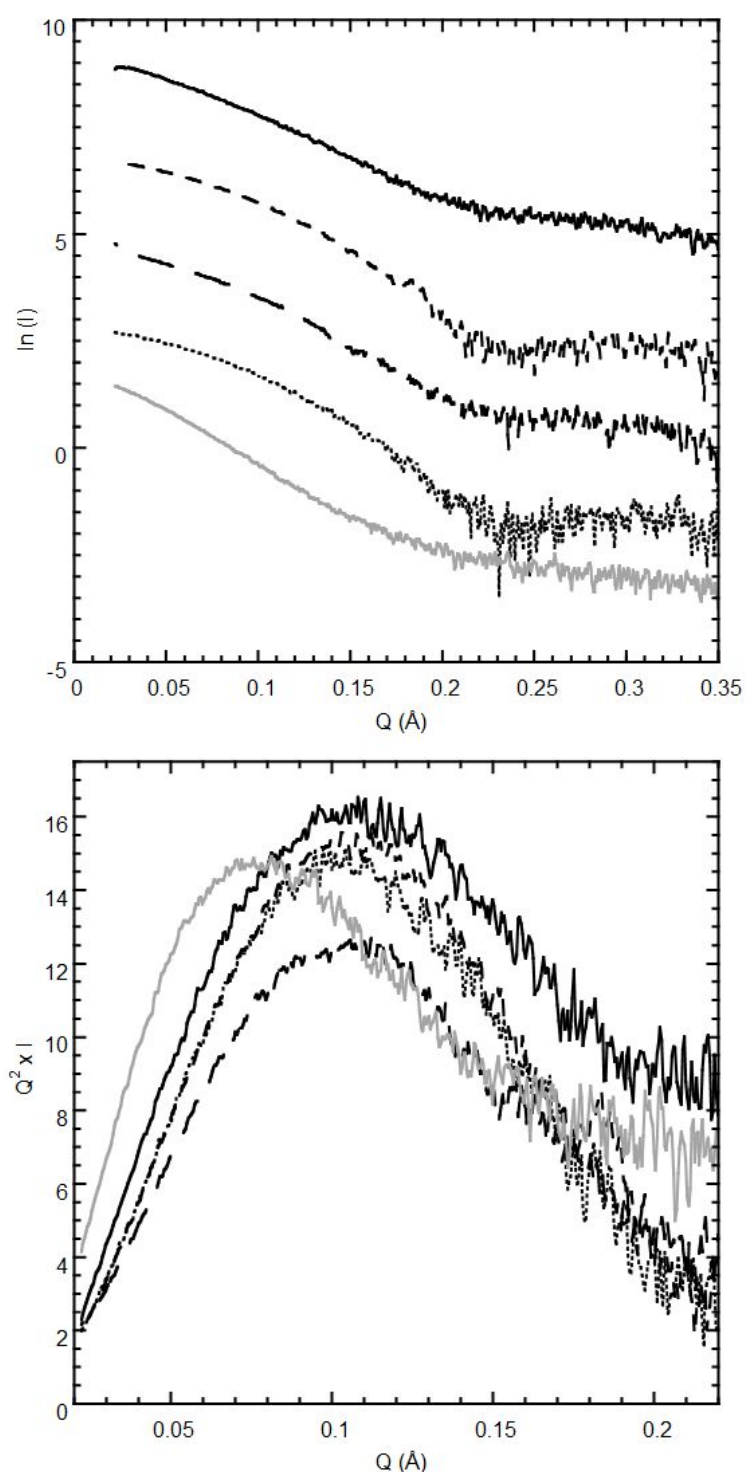


Figura 21. Perfiles SAXS de muestras de YLSCP2 $\sim 160 \mu\text{M}$ con diferentes ligandos (panel superior) y los respectivos "gráficos de Kratky" (panel inferior). Las curvas corresponden a YLSCP2 sola (línea negra) y con el agregado de COL (línea de rayas), PAL (línea de rayas grandes), ANS (línea punteada) y pCoA (línea gris).

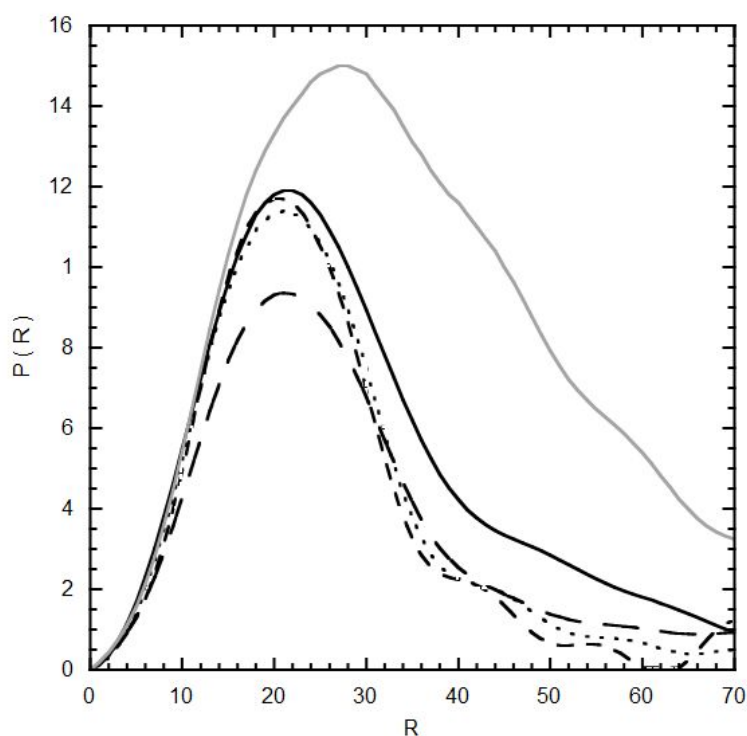


Figura 22. Gráficos de distribución de pares de distancias (P) en función de la distancia R , obtenidos a partir de los espectros SAXS de muestras de YLSCP2 con diferentes ligandos. Las curvas corresponden a YLSCP2 sola (línea negra) y con el agregado de COL (línea de rayas), PAL (línea de rayas grandes), ANS (línea punteada) y pCoA (línea gris).

Tabla VI. Radio de giro de YLSCP2 en presencia de ligandos.

Radio de giro (R_G) promedio de YLSCP2 en ausencia y presencia de distintos ligandos, determinado a partir de las funciones de distribución de pares de distancias.

Muestra	R_G (Å)
YLSCP2 162 μ M	24.6
YLSCP2 162 μ M + COL 175 μ M	19.8
YLSCP2 162 μ M + PAL 170 μ M	27.2
YLSCP2 162 μ M + ANS 182 μ M	19.5
YLSCP2 162 μ M + pCoA 170 μ M	30.8

2.III.d. Estabilidad térmica

Los efectos de la unión de ligandos sobre la estructura secundaria, terciaria y el estado de agregación de YLSCP2 son diferentes para cada clase de ligando. Estos resultados son interesantes, pero no suficientes para determinar los cambios en la estabilidad de YLSCP2 inducidos por la unión de ligandos. Para esto fue estudiado el efecto de la unión de ligandos sobre la estabilidad de YLSCP2 por desplegado inducido

por temperatura, usando la señal de dicroísmo circular (CD) a 220 nm como sonda del contenido de estructura secundaria (Figura 23). Los parámetros de desplegado para cada ensayo fueron obtenidos mediante el ajuste de un modelo de desplegado de dos estados (Tabla VII). Los resultados muestran que la unión de AP, pCoA (a concentraciones mayores que su CMC) y ANS produce una disminución de la estabilidad de YLSCP2. Esto está de acuerdo con la disminución de la señal observada en los espectros de CD en el UV-lejano para AP y ANS. El resto de los lípidos utilizados (incluyendo al pCoA a concentraciones menores que su CMC) no producen cambios significativos en la estabilidad de YLSCP2.

La unión de ligandos a las proteínas normalmente induce cambios en la temperatura media (T_m), la entalpía y la capacidad calorífica de desplegado debido a la combinación de los procesos de unión y desnaturalización [187][188][189][190]. Está postulado que la unión de un ligando a una proteína siempre induce un aumento de T_m [187][191] y que la unión de un ligando a estados no nativos (conformaciones alternativas probablemente inducidas por la unión) puede producir una disminución de T_m [192].

Los resultados obtenidos para la interacción de YLSCP2 con ligandos muestran que la T_m no cambia por la unión de PAL y pCoA (concentración menor que CMC), disminuye con la unión de AP y pCoA (concentración mayor que CMC) y aumenta por la unión de ANS, DPG y EPC (Tabla VII). Esto sugiere que la unión de los ligandos AP y pCoA (concentración mayor que CMC) inducen un cambio conformacional en YLSCP2 o un desplazamiento hacia una conformación alternativa. En los casos que no se observan cambios (PAL y pCoA (concentración menor que CMC)), es posible que se estén promediando efectos que aumentan (unión al estado nativo) y disminuyen (unión a conformaciones alternativas) el valor de T_m . Finalmente, la unión de ANS, DPG y EPC al estado nativo de YLSCP2 presentaría mayor afinidad que para otras conformaciones. También es posible que un ligando lipídico se una a estados parcialmente plegados de YLSCP2 debido a las características hidrofóbicas de estos ligandos y la exposición de los residuos hidrofóbicos de la proteína.

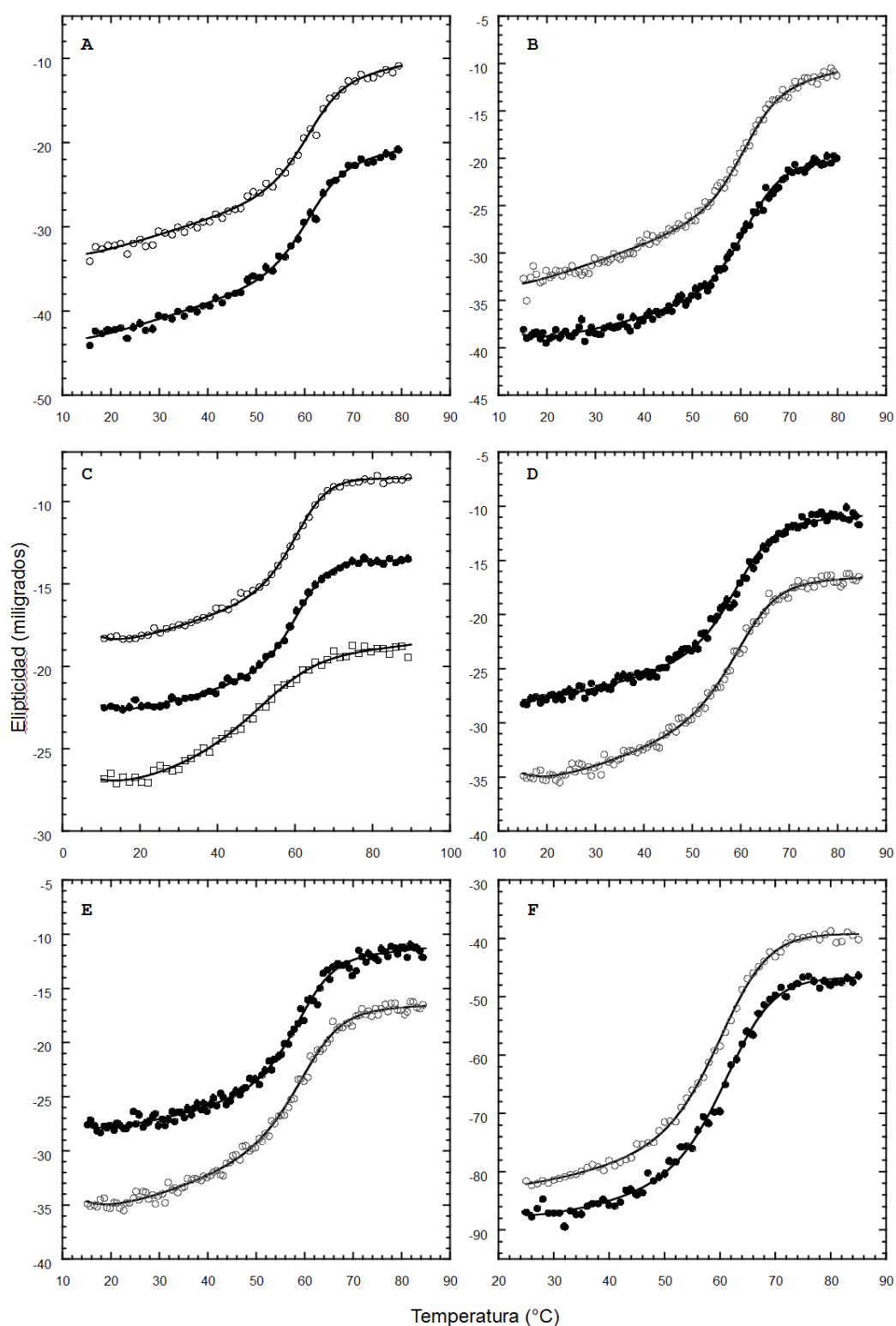


Figura 23. Desplegado de YLSCP2 ~ 3 μM inducido con temperatura, en presencia de (A) ácido *cis*-párinárico, (B) ácido palmítico, (C) palmitoil-Coenzima A (1 equivalente gris, 3 equivalentes:rayas), (D) 1,2-dipalmitoil-sn-glicerol, (E) fosfatidil colina de huevo y (F) ácido 1-anilina-naftalen-8-sulfónico.

Tabla VII. Parámetros de desplegamiento inducido por temperatura de YLSCP2 en presencia de ligandos.

A partir de los datos de desplegamiento inducido por temperatura fueron obtenidos los siguientes parámetros: la temperatura a la cual la energía libre es cero (T_m , °C), la capacidad calorífica a presión constante (C_p , kcal mol⁻¹ K⁻¹), la entalpía (ΔH^{T_m} , kcal mol⁻¹) y la energía libre a 25 °C ($\Delta G^{25^\circ\text{C}}$, kcal mol⁻¹). Los resultados fueron obtenidos en ensayos independientes, por lo que se muestran en tablas separadas.

Muestra	T_m	ΔC_p	ΔH^{T_m}	$\Delta G^{25^\circ\text{C}}$
YLSCP2	59.0 ± 0.1	1.49 ± 0.09	46.0 ± 0.4	2.02 ± 0.13
YLSCP2 + ANS (1:3)	61.9 ± 0.3	2.30 ± 0.15	55 ± 2	1.19 ± 0.12

Muestra	T_m	ΔC_p	ΔH^{T_m}	$\Delta G^{25^\circ\text{C}}$
YLSCP2	60.3 ± 0.2	1.48 ± 0.09	49.7 ± 0.6	2.4 ± 0.2
YLSCP2 + AP	59.3 ± 0.2	1.90 ± 0.13	51 ± 2	1.79 ± 0.01
YLSCP2 + PAL	60.0 ± 0.01	1.78 ± 0.05	52.0 ± 0.8	2.06 ± 0.05

Muestra	T_m	ΔC_p	ΔH^{T_m}	$\Delta G^{25^\circ\text{C}}$
YLSCP2	57.7 ± 0.1	1.33 ± 0.07	42 ± 1	1.96 ± 0.01
YLSCP2 + DPG	58.5 ± 0.1	1.54 ± 0.05	46.6 ± 0.7	2.01 ± 0.02
YLSCP2 + EPC	58.1 ± 0.1	1.75 ± 0.10	50 ± 2	2.00 ± 0.08

Muestra	T_m	ΔC_p	ΔH^{T_m}	$\Delta G^{25^\circ\text{C}}$
YLSCP2	60.3 ± 0.1	1.48 ± 0.01	47.8 ± 0.4	2.18 ± 0.07
YLSCP2 + pCoA (1:1)	60.2 ± 0.1	1.56 ± 0.05	49 ± 2	2.20 ± 0.07
YLSCP2 + pCoA (1:3)	50.3 ± 0.1	0.66 ± 0.01	18.4 ± 0.2	0.77 ± 0.01

La capacidad calorífica (ΔC_p) y la entalpía (ΔH) del proceso de desplegamiento aumentan luego de la unión de los ligandos, excepto en el caso del pCoA formando micelas. Este aumento de ΔC_p indicaría que el cambio de superficie expuesta al solvente durante el desplegamiento es mayor cuando YLSCP2 tiene unido un ligando. Probablemente la cavidad hidrofóbica de la proteína se encuentre parcialmente expuesta cuando no está unido el ligando, lo que explicaría que el valor de ΔC_p de YLSCP2 es menor al esperado. La unión del ligando estaría ocultando residuos de esta cavidad hidrofóbica y aumentando el valor de ΔC_p . Por otro lado, el aumento de ΔH sugiere que se requiere una mayor energía para romper las interacciones débiles cuando está unido el ligando a YLSCP2. En conjunto, estos parámetros demuestran que algunos de los ligandos se unen a YLSCP2 e inducen un cambio conformacional marcado o una reorganización del solvente en contacto con la proteína.

3. Discusión

Los objetivos para la caracterización funcional de YLSCP2 fueron determinar el perfil de unión de ligandos, la interacción con membranas y el efecto de estas interacciones sobre la proteína. En primer lugar fue demostrado que YLSCP2 puede unir con alta afinidad ácido *cis*-parinámico (AP), ácido palmítico (PAL), palmitoil-Coenzima A (pCoA), 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicerol (DPG), fosfatidil colina de huevo (EPC), dehidroergosterol (DHE), ácido 1-anilinaftalen-8-sulfónico (ANS) y merocianina-540 (MC). La unión de los ligandos fue determinada mediante diferentes técnicas, dependiendo de las propiedades de cada ligando. Para los ligandos AP, ANS, DHE y MC la unión fue determinada directamente mediante la fluorescencia intrínseca del ligando. En el caso del AP, esta característica fue aprovechada luego para determinar la unión de ligandos no fluorescentes mediante desplazamiento. Además de obtener la constante de afinidad, los resultados de desplazamiento de AP son importantes para determinar si los ligandos utilizados comparten el mismo sitio de unión. La cavidad hidrofóbica de YLSCP2 tiene forma de "L" y podría acomodar más de un ligando en simultáneo (como ya fuera reportado para AeSCP2-L2 [94]). Por esto, es probable que el desplazamiento de AP no se corresponda directamente con la unión en un mismo sitio, sino que también es posible que los sitios de unión se solapen, o que un cambio conformacional inducido por la unión del ligando modifique el sitio de unión del AP liberándolo.

Además de la unión de ligandos hidrofóbicos, fue demostrado que YLSCP2 interacciona con vesículas lipídicas. La interacción de YLSCP2 con membranas produce un aumento del contenido de estructura secundaria y terciaria de la proteína. La transferencia de lípidos entre membranas aumenta cuando las vesículas tienen carga negativa. El mecanismo de interacción propuesto involucra gran parte de la proteína en la interacción con membranas, ubicando al sitio de unión en los residuos que forman el potencial electrostático positivo (capítulo II). Este mecanismo difiere del propuesto para hSCP2, donde el sitio de unión se ubica en la hélice- α del extremo N-terminal [126][172]. En trabajos publicados por otros grupos se analiza solamente el contenido de estructura hélice- α de la proteína cuando interacciona con membranas, sin mencionar los posibles cambios de la estructura hoja- β . Los estudios de la interacción con membranas del péptido con la secuencia correspondiente a la hélice- α del extremo N-terminal indican que un péptido desorganizado (con potencial para formar una hélice en SCP2) se une a membranas y forma una estructura hélice- α . Este resultado puede deberse a una interacción que estabiliza una conformación helicoidal en el péptido pero no prueba que el mismo sea el dominio de unión a membranas de SCP2. Existen otros trabajos donde se demuestra que péptidos desorganizados pueden adoptar estructura con el agregado de

solventes con TFE [193][194].

Por otro lado, la hélice debe encontrarse parcial o totalmente desorganizada en la conformación nativa para que el aumento de elipticidad observado en SCP2 se corresponda a cambios estructurales del extremo N-terminal, lo que no concuerda con las estructuras reportadas. En el caso de YLSCP2, el aumento del contenido de estructura no se puede explicar solamente con la reorganización de los residuos de la hélice- α del extremo N-terminal. El análisis de la estructura modelo de YLSCP2 demuestra que un aumento del 6 - 7 % de la estructura hélice- α se corresponde con la organización de 29 - 37 residuos. Los valores reportados para otras SCP2 son similares a los obtenidos en esta tesis, indicando que la misma cantidad de residuos debería reorganizarse para obtener un cambio estructural semejante [126].

La característica anfipática de la hélice- α del extremo N-terminal, que posee una parte de la cara hidrofílica compuesta por cargas positivas, parece poca evidencia para ubicar en ella al sitio de interacción con membranas. Las SCP2 poseen un pI básico y presentan cargas positivas en gran parte de la superficie. En YLSCP2, esas cargas forman un potencial electrostático que parece ser el sitio de interacción más probable con membranas.

En el caso de la interacción de YLSCP2 con ligandos, se observa que los mismos producen diferentes efectos sobre la estructura y estabilidad de la proteína, los que podrían estar relacionados con el mecanismo de unión de lípidos de esta proteína. El agrupamiento de los ligandos según los efectos que producen sobre YLSCP2 puede ser de utilidad para proponer un mecanismo de unión. El contenido de estructura y la estabilidad de YLSCP2 disminuye con la unión de AP y ANS, mientras que el contenido de estructura aumenta luego de la unión de PAL, DPG y EPC sin presentar cambios significativos en la estabilidad de YLSCP2. Por otro lado, el contenido de estructura no se afecta significativamente por la unión de pCoA, DHE y colesterol. Esto sugiere la presencia de al menos tres mecanismos diferentes para la unión de ligandos a YLSCP2.

La unión de ligandos a las proteínas puede representarse de la misma forma que el proceso de desplegamiento, utilizando un gráfico con forma de embudo [195]. Las proteínas que unen una gran variedad de ligandos presentan una mayor flexibilidad que aquellas que unen un tipo específico de sustrato, presentando una población de especies en diversas conformaciones. Así, cuando una conformación une un tipo de ligando, otra conformación puede presentar una mayor afinidad por otro tipo de ligando [196]. Estos diferentes estados conformacionales dan una forma rugosa al fondo del embudo de unión, con barreras energéticas bajas entre los estados, lo que permite la unión de una gran variedad de ligandos [197]. Las transiciones entre estos estados inducida por la unión de ligando puede producir un aumento o disminución de la estabilidad global de la proteína, según el

grado de afinidad del ligando por los estados nativo o desplegado [195].

Aplicando este modelo a la unión de ligandos a YLSCP2 podríamos suponer la existencia de al menos tres conformaciones, una que presentaría menor estabilidad global, otra con igual estabilidad pero mayor contenido de estructura y una tercera que no presenta diferencias significativas con el estado de YLSCP2 sin ligando (Figura 24). Es posible que la forma dimérica de YLSCP2 sea otra conformación con relevancia biológica, por lo que se suman al menos dos conformaciones más (dímero y dímero en complejo con ligandos). Sin embargo, cada ligando presenta efectos diferentes, por lo que es probable que existan más conformaciones posibles de YLSCP2.

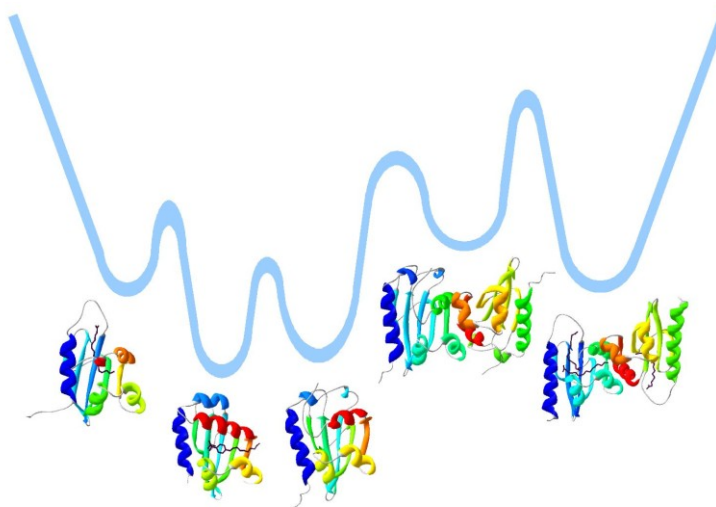


Figura 24. Esquema de una ampliación del fondo del embudo conformacional para la unión de ligandos de YLSCP2. La conformación de la proteína sin ligando cambia en contenido de estructura y estabilidad luego de la unión de diferentes ligandos, o luego de la formación del dímero. Los ligandos (ácido palmítico o Tritón X-100) se muestran con líneas negras y los elementos de estructura secundaria de la proteína se indican con diferentes colores según el orden estructural. Las líneas celestes representan los saltos energéticos entre las diferentes conformaciones.

Capítulo V

CONCLUSIONES



1. Caracterización de YLSCP2

El objetivo principal de este trabajo de tesis fue la caracterización bioquímica y biofísica de YLSCP2 como base para determinar el mecanismo de función de las SCP2 y para posibles estudios *in- vivo*. A continuación se presentan las conclusiones generales obtenidas a partir del análisis global de los resultados presentados.

1.I. Aspectos estructurales

Los resultados obtenidos en la caracterización estructural de YLSCP2 permiten concluir que esta proteína presenta una estructura secundaria tipo $\alpha + \beta$ típica de la familia SCP2 y una estructura terciaria altamente organizada, con propiedades hidrodinámicas correspondientes a una forma dímica cuando la concentración de proteína es mayor a 100 μM .

Los ensayos de dicroísmo circular (CD) en el UV-lejano, fluorescencia de triptofano y atenuación de la fluorescencia de triptofano concuerdan con los resultados reportados anteriormente para otros miembros de las SCP2 [96][97][103][100][101]. Además, el modelo estructural de YLSCP2 obtenido por homología presenta una estructura similar a la resuelta para otros miembros de las SCP2. Todo esto aporta más evidencias para confirmar que la estructura de las SCP2 se encuentra muy conservada entre los diferentes reinos biológicos.

Otros ensayos estructurales de YLSCP2 presentaron resultados novedosos. El espectro de CD en el UV-cercano de YLSCP2 fue el primero reportado para una SCP2, y el único hasta nuestro conocimiento. Este espectro es una huella digital de la estructura terciaria de YLSCP2 y es una herramienta poderosa para detectar cambios conformacionales en la proteína. Por otro lado, los espectros de SAXS de YLSCP2 presentados son los primeros reportados para esta familia de proteínas. El análisis del estado hidrodinámico de YLSCP2 mediante SAXS y entrecruzamiento químico demuestra que esta proteína forma dímero a altas concentraciones. Este es el primer reporte de la formación de dímero para una SCP2 de microorganismos.

1.II. Estabilidad

La caracterización termodinámica de YLSCP2 permite concluir que esta proteína presenta una estabilidad media, con una transición de desplegado cooperativa y compleja. La estabilidad de YLSCP2 fue estudiada mediante desplegado inducido por temperatura y por el agregado de urea. Los parámetros de desplegado inducido por temperatura

presentan un valor de ΔCP bajo, sugiriendo que el estado desplegado podría ser en realidad un intermediario o que el estado nativo presenta mayor superficie expuesta que la esperada. La desnaturalización inducida por el agregado de urea indica la presencia de al menos dos intermediarios. Sin embargo, los intermediarios y las transiciones de desplegado inducido por temperatura y por el agregado de urea pueden no ser las mismas.

El desplegado de YLSCP2 por el agregado de urea fue analizado mediante diversas sondas (CD, fluorescencia, unión de ANS y SAXS). Este fue el primer análisis exhaustivo del proceso de desplegado de una SCP2. El uso de diferentes sondas fue indispensable para determinar la presencia de intermediarios de desplegado. Además, a partir del modelo estructural de YLSCP2 fue posible interpretar el comportamiento de la fluorescencia del triptofano observado en el desplegado inducido por urea.

2. Análisis funcional de YLSCP2

Los resultados obtenidos en la caracterización funcional de YLSCP2 demuestran que esta proteína posee la habilidad de unir una gran variedad de ligandos hidrofóbicos con muy alta afinidad y también de interaccionar con membranas. El análisis del efecto de la unión de ligandos sobre la estructura y estabilidad de YLSCP2 indica que diferentes ligandos producen diferentes efectos, posiblemente debido a mecanismos de unión diferenciales.

2.I. Perfil de afinidad

La afinidad de YLSCP2 es de orden nano-micromolar por los ligandos ácido parinámico (AP), ácido palmítico (PAL), palmitoil-Coenzima A (pCoA), 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicerol (DPG), fosfatidilcolina de huevo (EPC), dehidroergosterol (DHE), ácido 1-anilino-8-naftalensulfónico (ANS) y merocianina 540 (MC). Según la estructura de YLSCP2 el sitio de unión de ligandos tiene forma de "L", siendo posible diferentes posiciones para los ligandos. A partir de los ensayos de desplazamiento de AP, podemos concluir que PAL, ANS, pCoA, DPG y EPC se unen al mismo sitio que el AP o que inducen con su unión un cambio conformacional que disocia el AP del sitio de unión.

2.II. Interacción con membranas

La interacción de YLSCP2 con membranas produce un aumento del contenido de estructura de la proteína, sin cambios significativos en la estabilidad. Esta propuesto que el

sitio de interacción con membranas de YLSCP2 se encuentra en la hélice- α del extremo N-terminal, debido a su carácter anfipático [126][172]. Sin embargo, existe un potencial electrostático positivo cerca del extremo C-terminal de YLSCP2 (presente en otras SCP2) que podría ser el responsable de la unión de SCP2 con membranas. Este tipo de interacción concuerda con los resultados reportados donde se observa mayor interacción de las SCP2 con membranas cargadas negativamente.

2.III. Efecto de la unión de ligandos

La unión de algunos ligandos produce cambios en la conformación y la estabilidad de YLSCP2. El análisis exhaustivo de los efectos de la unión de ligandos sobre YLSCP2 fue el primero realizado para una proteína de la familia de las SCP2. Los resultados sugieren que existen al menos 3 mecanismos de unión de ligandos. Uno de estos mecanismos está relacionado con la unión de AP y ANS, los cuales producen una disminución del contenido de estructura y estabilidad de YLSCP2. El siguiente mecanismo se observa luego de la unión de PAL, DPG y EPC, que induce un aumento del contenido de estructura sin presentar cambios significativos en la estabilidad de YLSCP2. El último mecanismo implica la unión de pCoA, DHE y colesterol, donde el contenido de estructura y la estabilidad no se afectan significativamente.

3. YLSCP2: modelo para el estudio de las SCP2

3.I. Análisis biofísico de YLSCP2

La caracterización biofísica de YLSCP2 presentada en esta tesis demuestra que esta proteína presenta las características estructurales y funcionales típicas de la familia de las SCP2. Los resultados obtenidos indican que YLSCP2 es una proteína adecuada para utilizar como modelo de estudio de esta familia de proteínas. El conocimiento de las propiedades estructurales, termodinámicas y funcionales de YLSCP2 son fundamentales para comprender su funcionamiento *in-vivo*.

Los resultados aportados por esta tesis se complementan con los obtenidos por otra línea de investigación del laboratorio basada en la cristalización de la proteína en complejo con diferentes ligandos. El sistema de expresión de YLSCP2 es ideal para la producción de cristales debido a la gran cantidad de proteína obtenida con alta pureza. Los estudios de dimerización de YLSCP2 a alta concentración de proteína fueron cruciales para establecer un paso adicional de purificación. Actualmente se han producido algunos cristales de buena calidad, los cuales serán analizados próximamente.

3.II. Transferencia de ligandos a membranas mediada por YLSCP2

La actividad por la cual fueron descubiertas las SCP2 fue la transferencia de lípidos entre membranas. La actividad de YLSCP2 fue determinada en colaboración con el laboratorio de la Dra. Córscico [125]. En este aspecto también fue demostrado que YLSCP2 presenta características representativas de la familia de las SCP2. Además, los resultados obtenidos fueron los primeros reportados para una SCP2 de microorganismos y proponen un mecanismo de transferencia de tipo "colisional". La actividad de transferencia de lípidos entre membranas mediada por YLSCP2 es mayor en presencia de lípidos cargados negativamente, lo que podría tener relevancia biológica. Esta información confirma que YLSCP2 podría ser una proteína ideal para el estudio de la función de las SCP2.

3.III. Ensayos de la función in- vivo de YLSCP2

Las proteínas que conforman la familia de las SCP2 pueden ser proteínas de dominio único o enzimas multifuncionales. La familia de genes SCP2 es particularmente compleja en el caso de los mamíferos, otros animales, protistas y artrópodos. En algunos de estos organismos también existen otras proteínas pequeñas transportadoras de lípidos (SLBP) además de las SCP2. Por esto, nosotros proponemos el estudio de las SCP2 en organismos eucariotas simples, donde la proteína es de dominio único y, en algunos casos, no se expresan otras SLBP.

La levadura *Yarrowia lipolytica* es un organismo ideal para el estudio de una proteína involucrada en el metabolismo de lípidos. Esta levadura es capaz de crecer en medios de cultivo conteniendo sólo ácidos grasos como fuente de carbono y presenta un metabolismo de compuestos hidrofóbicos altamente especializado.

La expresión de YLSCP2 se induce cuando la levadura se encuentra en un medio de cultivo conteniendo ácido palmítico. Esta proteína es detectada en peroxisomas, de acuerdo con la secuencia de direccionamiento a peroxisomas presente en el extremo C-terminal de su secuencia [125][198] Es probable que YLSCP2 actúe como mecanismo de disolución de sustratos hidrofóbicos para facilitar la acción de las enzimas involucradas en la degradación de estos compuestos. Además, YLSCP2 podría ser el nexo entre las membranas cargadas de lípidos y estas enzimas.

4. Perspectivas

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis pueden ser la base para nuevos proyectos de investigación. El objetivo principal de la tesis fue la caracterización de

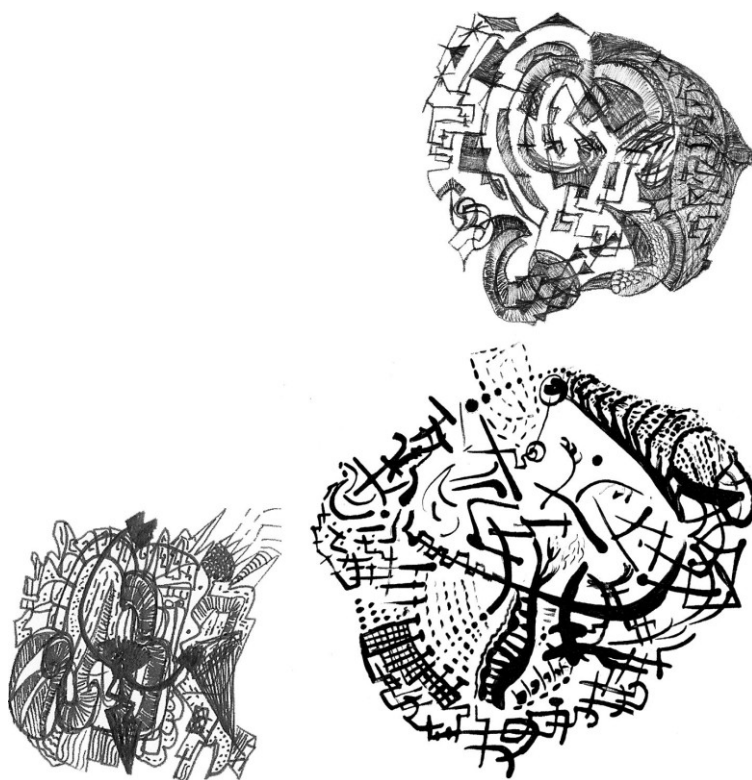
YLSCP2 como modelo para el estudio de la familia de las SCP2. Sin embargo, el mecanismo de unión de lípidos a proteínas abarca un amplio grupo de proteínas. La comparación del mecanismo de unión de lípidos entre las SCP2 y otras SLBP puede ser una línea de investigación novedosa que aplique las técnicas y resultados presentados. Las SLBP más conocidas hasta el momento son la proteína transportadora de ácidos grasos (FABP) y la proteína transportadora de acil-CoA (ACBP). Aunque las SCP2 unen un rango de ligandos que abarca los de FABP y ACBP, el mecanismo de interacción con membranas de estas proteínas es muy similar [199]. El estudio comparativo de la unión de lípidos e interacción con membranas de FABP, ACBP y SCP2 podría develar mecanismos altamente conservados para la interacción proteína-lípido.

Otro aspecto interesante de las SCP2 es su posible relación con el desarrollo de enfermedades conectadas con el metabolismo de lípidos como diabetes, aterosclerosis y "mal de Alzheimer". Los trabajos publicados acerca del rol de SCP2 en estas enfermedades son resultado de ensayos biológicos, donde puede ser compleja la interpretación. La realización de ensayos biofísicos podría ser de utilidad para identificar interacciones proteína-proteína implicadas en estas enfermedades o modificaciones conformacionales que alteren la función de SCP2.

Finalmente, la capacidad de YLSCP2 para unir diversos ligandos con alta especificidad permitiría utilizar a esta proteína como modelo para sondear el mapa conformacional del embudo de unión de ligandos. Para esto se podrían aplicar técnicas computacionales de dinámica molecular junto con las técnicas experimentales como calorimetría de titulación isotérmica (ITC), calorimetría diferencial de barrido (DSS), resonancia magnética nuclear (RMN), etc. El análisis de las conformaciones alternativas inducidas por la unión de ligandos con sus respectivos cambios de energía libre permitiría obtener un esquema detallado del embudo conformacional de unión.

Capítulo VI

MATERIALES Y MÉTODOS



1. Biología Molecular

1.I. *Yarrowia lipolytica* CX- 121- 1B

La cepa CX-121-1B de *Yarrowia lipolytica* posee auxotrofia para adenina (*ade2*) y fue gentilmente cedida por el Dr. J. R. Matoon (Universidad de Colorado, EE.UU.). Los cultivos de levaduras se incuban de forma aeróbica en erlenmeyers con medio LB (Tabla I), a 30 °C y 220 rpm. Cuando el cultivo de levaduras llega a la fase exponencial, la biomasa es colectada por centrifugación y almacenada a - 20 °C.

1.I.a. *Tabla I. Composición de los medios de cultivos [200].*

Abreviatura	Nombre	Composición
LB	Luria-Bertani	cloruro de sodio 10 g/L, triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L
LB-Km	Luria-Bertani con kanamicina	cloruro de sodio 10 g/L, triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, kanamicina 50 µg/mL
LB-Km-agar	Luria-Bertani con kanamicina y agar	cloruro de sodio 10 g/L, triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, kanamicina 50 µg/mL, agar 15 g/L
SOC	SOC	cloruro de sodio 0.5 g/L, triptona 20 g/L, extracto de levadura 5 g/L, cloruro de potasio 2.5 mM, cloruro de magnesio 10 mM, glucosa 20 mM, llevado a pH = 7 con ~ 0.2 ml de hidróxido de sodio 5 M

1.II. *Purificación de ADN de Y. lipolytica*

El ADN de *Yarrowia lipolytica* fue obtenido mediante un protocolo rápido de purificación de ADN [201]. Las células de levaduras se rompen agregando 0.2 mL de Buffer RC (Tabla II), 200 µL de una suspensión de bolillas de vidrio y 0.2 mL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) por cada 5 mL de cultivo. Se mezcla vigorosamente durante 3 minutos, luego se agregan 0.2 mL de Buffer TE (Tabla II), se centrifuga durante 5 minutos y se trasvasa la fase acuosa a un tubo nuevo. Sobre esta fase acuosa se agrega 1 mL de etanol 100 % a temperatura ambiente y se mezcla por inversión. Luego se centrifuga durante 2 minutos y se lava el precipitado con etanol 70 %. Este precipitado se disuelve en 0.4 mL de Buffer TE, RNAsa (Sigma) 0.02 µg/mL final y 0.4 mL de cloroformo, y se deja incubando durante 10 minutos a temperatura de ambiente. Finalmente, el ADN es precipitado agregando 10 µL de acetato de amonio 4 M y 1 mL de etanol 100 %, centrifugando 2 minutos y dejando secar el precipitado. El ADN que se

encuentra en el precipitado se disuelve en 50 μ L de Buffer TE.

1.II.a. Tabla II. Composición de las soluciones para biología molecular.

Las concentraciones en porcentaje (%) se refieren a % p/v a no ser que se especifique lo contrario. Las soluciones marcadas con asterisco (*) no tienen indicadas las concentraciones porque corresponden a las soluciones preparadas por el proveedor correspondiente (ver texto).

Abreviatura	Nombre	Composición
Buffer RC	Ruptura celular	tris-HCl 10 mM pH 8.0, Triton® X-100 2 % (v/v), SDS 1 %, NaCl 100 mM, EDTA 1mM
Buffer TE	Tris-EDTA	tris-Borato 45 mM pH 8.0, EDTA 1 mM
Buffer TAE	Electroforesis de agarosa	tris-acetato 0.04 M, EDTA 0.001 M
Buffer SE	Siembra electroforesis	glicerol 5 % (v/v), azul de bromofenol 0.1 %
Buffer L1*	Solubilización	contiene perclorato de sodio, acetato de sodio y TBE
Buffer L2*	Lavado	contiene cloruro de sodio, EDTA y Tris-HCl
Buffer <i>Pfu</i>	Amplificación	tris-HCl 200 mM pH 8.8, MgSO ₄ 20 mM, KCl 100 mM, (NH ₄) ₂ SO ₄ 100 mM, Triton® X-100 1 % (v/v), BSA 1 mg/mL
Buffer TE2	Tris-HCl-EDTA	tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 0.1 mM
Buffer ER	Enzimas de restricción	tris-acetato 0.02 M pH 7.9, acetato de potasio 50 mM, acetato de magnesio 10 mM, DTT 1 mM
Buffer LG	Ligación	tris-HCl 30 mM pH 7.8, MgCl ₂ 10 mM, DTT 10 mM, ATP 0.5 mM

1.III. Amplificación del gen de YLSCP2

El gen correspondiente a YLSCP2 fue amplificado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando la ADN polimerasa *Pfu* provista por Stratagene (La Jolla, CA, EE. UU.). Los oligonucleótidos iniciadores fueron diseñados en base a la secuencia del ADN genómico reportado para *Yarrowia lipolytica* CLIB122 [19]. La temperatura de fusión y el contenido de estructura de los oligonucleótidos fue determinada utilizando el programa *RNA draw* (Ole Matzura, Karolinska Institute, Solna, Suecia). Los productos de amplificación fueron simulados utilizando el programa *Amplify* (Bill Engels® 1992, University of Wisconsin, Madison, EE.UU.). Una vez obtenida la secuencia adecuada de los oligonucleótidos los mismos fueron enviados a sintetizar a QIAGEN® Operon® (Cologne, Alemania). El gen completo fue amplificado por PCR utilizando los

oligonucleótidos iniciadores 5'ylscp2 y 3'ylscp2-BamHI (Tabla III) y el producto fue secuenciado (ver más adelante). El gen fue amplificado nuevamente utilizando los oligonucleótidos 5'ylscp2-NdeI y 3'ylscp2-BamHI (Tabla III), los cuales incorporan sitios de corte para las enzimas de restricción correspondientes. Las reacciones de PCR se realizaron según un procedimiento general descrito previamente [202]. En resumen, se prepara una solución con 1.5 mM MgSO₄, 200 µM de cada dNTP, 1 µM de cada oligonucleótido iniciador, 0.5-1.0 nM ADN molde y 1.0-1.5 unidades de *Pfu*, todo disuelto en Buffer *Pfu* (Stratagene, EE. UU.). Luego se coloca esta mezcla de reacción en un equipo ciclador Mastercycler® gradient (Eppendorf GA, Hamburgo, Alemania), con el cual se realizan 30 ciclos de 55 minutos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C y 1 minuto a 72 °C.

1.III.a. Tabla III. Fragmentos de ADN iniciadores para PCR.

Nombre	Secuencia
5'ylscp2	GTTTAGCTCCCCAGAATATC
3'ylscp2-BamHI	GTTGC GGATCCAATATAGTAAATCATC
5'ylscp2-NdeI	TCATTACACAAAAACACATATGTCTCTC

1.IV. Secuenciación de ADN

El fragmento de ADN obtenido luego de la PCR con los oligonucleótidos 3'ylscp2 y 5'ylscp2-BamHI (Tabla III) fue purificado a partir del gel de agarosa (ver más adelante). La secuenciación del ADN fue realizada en el INTA (Castelar, Buenos Aires, Argentina). El resultado fue analizado con el programa Bioedit 7.0.9 (T. Hall, Ibis Biosciences, Carlsbad, CA).

1.V. Electroforesis en geles de agarosa

Los geles de agarosa para electroforesis de ADN fueron realizados con un porcentaje de agarosa adecuado según el tamaño del fragmento de interés. En el caso de los plásmidos linealizados fueron utilizados geles de 0.7-0.8 % (p/v), mientras que para los fragmentos de menor tamaño fueron empleados geles de hasta 1.75 % (p/v). En todos los casos la solución de agarosa fue preparada en Buffer TE (Tabla II) con bromuro de etidio 0.5 µg/mL. Las muestras de ADN a analizar fueron diluidas en Buffer SE (Tabla II) y sembradas en el gel ubicado en una cuba horizontal (BIORAD®). La corrida fue realizada aplicando un voltaje de 90 V o menor, durante aproximadamente 30 minutos. El resultado

de la corrida fue visualizado iluminando el gel de agarosa con un transiluminador UV (254 nm, LabNet).

1.VI. Purificación de ADN de geles de agarosa

Luego de detectar la banda de interés resuelta por electroforesis, el fragmento de agarosa correspondiente fue cortado, pesado y utilizado para la purificación del ADN utilizando el kit comercial Concert™ (Life Technologies GIBCO BRL, U.K.). Por cada 10 mg de agarosa se agregan 30 µL de Buffer L1 (Tabla II) y 1 µL de resina Concert™. Esta mezcla se incubaba a 50 °C durante 15-20 minutos, hasta la disolución del gel y luego se centrifuga a 12000 × g por 30 segundos. El sobrenadante se descarta y el precipitado se disuelve en 30 µL de Buffer L1 y se vuelve a centrifugar de igual forma. El sobrenadante se descarta, el precipitado se disuelve en 30 µL de Buffer L2 (Tabla II) y se centrifuga nuevamente. Finalmente se resuspende la resina en 10 a 20 µL de Buffer TE, se calienta a 50 °C por 5 minutos, se centrifuga a 12000 × g durante 1 minuto y el sobrenadante se conserva.

1.VII. Digestión de ADN

Para la digestión del ADN fueron utilizadas las enzimas de restricción *Nde I* y *Bam HI* adquiridas en Promega (Madison, WI, EE. UU.). El fragmento de PCR o el vector (1-3 µg) fue mezclado con 10 unidades de las enzimas de restricción, BSA 100 µg/mL y cantidad necesaria de Buffer ER (New England Biolab, Tabla II). Esta mezcla se incubaba a 37 °C durante 3 horas y luego se calienta a 60 °C durante 30 minutos para desactivar las enzimas. El resultado de la digestión se visualiza mediante electroforesis de agarosa. El producto de digestión del fragmento de PCR fue precipitado agregando 20 µL del ADN digerido, 2 µL de acetato de sodio 3 M pH = 5.5 y 50 µL de etanol absoluto. En el caso del vector linealizado, el ADN fue purificado a partir del gel de agarosa.

1.VIII. Ligación de ADN

El vector pET9b (Novagen EMD Biosciences, Darmstadt, Alemania), que confiere resistencia a kanamicina como método de selección, fue seleccionado para clonar el gen de YLSCP2. Para ligar el gen al vector fueron mezclados 1.5 µg de vector, 0.5 µg del producto de PCR conteniendo el gen de YLSCP2, 1 unidad de ADN ligasa T4 (Promega Corporation, EE.UU.) y la cantidad necesaria de Buffer LG 10 X (Promega Corporation, EE.UU., ver Tabla II). Esta mezcla fue incubada a 15 °C durante 12-16 horas y el resultado obtenido fue visualizado mediante electroforesis de agarosa. El vector conteniendo el gen

que codifica para YLSCP2 es denominado pET9bYLSCP2.

1.IX. Producción de bacterias competentes

El precultivo de bacterias competentes se prepara inoculando 2 mL de medio LB con un stock de bacterias *E. coli* JM109 o BL21(DE3), e incubando a 37 °C y 220 rpm durante 16 horas. Este precultivo se agrega sobre 200 mL de medio LB fresco y se incuba a 37 °C y 220 rpm hasta DO₆₀₀ ~ 0.5. Entonces, el cultivo se transfiere a un tubo de centrifuga estéril, se deja reposar en hielo durante 10 minutos y se centrifuga a 5000 rpm (rotor JA-14, Beckman, EE. UU.) durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se descarta y la biomasa se disuelve suavemente en 200 mL de glicerol 10 %, en baño de hielo. Esta solución se centrifuga y se repite sucesivamente el paso anterior disolviendo en 100, 50, 25 y finalmente en 0.4 mL de glicerol 10 %. La solución final es fraccionada en alícuotas de 80 µL que luego son almacenadas a - 86 °C.

1.X. Transformación de bacterias *E. coli* JM109

El plásmido pET9bYLSCP2 es replicado y almacenado en la cepa JM109 de *E. coli* [recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi Δ(lac-proAB)]. Para transformar las bacterias se electroporan 80 µL de bacterias competentes (descongeladas a 4 °C) con 1 - 2 µL del vector pET9bYLSCP2. La celda de electroporación (de 0.2 cm) se enfría en hielo y el electroporador (Bio-Rad) es programado a 2.5 kV. Las bacterias transformadas se incuban en 1 mL de medio de cultivo SOC (Tabla I) durante 1 hora a 37 °C y 220 rpm y luego se utilizan para inocular una placa de Petri con medio LB-Km-agar (Tabla I).

1.XI. Purificación de ADN plasmídico

Para la purificación del ADN plasmídico fue utilizado un protocolo de lisis alcalina descrito a continuación [203]. El ADN plasmídico es amplificado creciendo bacterias *E. coli* JM109 conteniendo el vector pET9bYLSCP2 durante 16 horas a 37 °C y 220 rpm. Las bacterias se cosechan por centrifugación, y se realizan tratamientos con lisozima y con NaOH 0.2 M, SDS 1 %. Los restos celulares se descartan por centrifugación (10000 rpm, 15 minutos) y las proteínas y el ARN se eliminan por precipitación con LiCL 2.5 M, tratamiento con ARNasa 0.02 µg/mL (10 minutos) y extracciones con fenol:cloroformo:isoamilalcohol (25:24:1), recuperando la fase acuosa. Finalmente el ADN se precipita agregando 2 volúmenes de etanol y se disuelve en el volumen necesario de agua desionizada para alcanzar una concentración de 1 µg/µL.

1.XII. Transformación de bacterias *E. coli* BL21(DE3)

Las bacterias *E. coli* de la cepa BL21(DE3) [*hsdSgal* (λ clts857 *ind1Sam7nim5 lac UV5- T7 genc1*)] fueron transformadas con el plásmido pET9bYLSCP2 para expresar la proteína. El protocolo de transformación fue el mismo que el utilizado para *E. coli* JM109, excepto que el vector pET9bYLSCP2 fue obtenido de *E. coli* JM109 (10 ng). Las bacterias transformadas fueron seleccionadas en placas de Petri con medio LB-Km-agar, las colonias positivas se aislaron, se resuspendieron en glicerol 10 % y se conservaron a - 86 °C [200].

2. Expresión y purificación de YLSCP2

2.1. Expresión de YLSCP2 en *E. coli* BL21(DE3)

La selección de un clon que presente buen nivel de expresión de proteína fue realizada mediante ensayos de expresión a pequeña escala. Para esto fueron realizados precultivos líquidos de células *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el plásmido pET9bYLSCP2 (1 mL de LB-Km) e incubados a 37 °C y 220 rpm durante 16 horas. Cultivos de 3 mL de medio LB-kanamicina 50 µg/mL fueron inoculados con los precultivos, e incubados a 37 °C y 220 rpm hasta alcanzar una DO600 ~ 1.0. El control de pre-inducción consiste en una alícuota de 1 mL del cultivo tomada antes de realizar la inducción y almacenada a - 20 °C. La inducción fue realizada agregando IPTG 1 mM e incubando a 37 °C por 3 horas con agitación a 200 rpm. Las bacterias fueron cosechadas por centrifugación (5000 rpm, 10 minutos) y la biomasa fue disuelta en Buffer LC (Tabla IV). La ruptura celular fue realizada con sonicador (Sonic Dismembrator 60, modelo F6, Fisher Scientific), aplicando 3 pulsos de 1 minuto y manteniendo la temperatura cercana a 0 °C. El perfil de expresión fue analizado mediante SDS-PAGE 10 %. Una vez obtenido el clon adecuado, una provisión de bacterias con 15 % glicerol fue almacenada a - 80 °C [200].

La expresión de YLSCP2 a gran escala se realiza inoculando un precultivo de 100 mL de LB-Km con la provisión de bacterias almacenada a - 80 °C. El precultivo se incuba durante 5 horas a 37 °C y 220 rpm y luego se utilizan alícuotas de 50 mL para inocular erlenmeyers con un litro de medio LB-Km. Los cultivos se incuban a 37 °C y 200 rpm hasta alcanzar una DO600 ~ 1.0. La expresión de YLSCP2 se induce con el agregado de lactosa sólida 1 % y después de 3 horas de inducción las bacterias se cosechan por centrifugación (5000 × g, 10 minutos, 4 °C). La biomasa obtenida se pesa y se almacena a - 20 °C.

2.I.a. Tabla IV. Composición de las soluciones Buffer para proteínas.

Las concentraciones en porcentaje (%) se refieren a % p/v a no ser que se especifique lo contrario.

Abreviatura	Nombre	Composición
Buffer LC	Lisis celular	tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 100mM
Buffer SB-2X	Electroforesis	tris-HCl 50 mM pH 6.8, glicerol 12 % (v/v), SDS 8 %, azul de bromofenol 0.005 %
Buffer A	Purificación	acetato de sodio 25 mM pH 5.5, urea 8 M, glicina 10 mM
Buffer B	Diálisis	fosfato de sodio 50 mM pH 7.0
Buffer C	Cromatografía de exclusión molecular	fosfato de sodio 100 mM pH 7.0
Buffer D	Digestión	bicarbonato de amonio 100 mM pH 8.5
Buffer E	Vesículas	tris-HCl 40 mM pH 7.4, NaCl 100 mM

2.II. Electroforesis en geles de poliacrilamida

La electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) fue realizada con geles con una densidad de poliacrilamida del 10 % [204]. Las muestras a analizar se diluyen al medio en Buffer SB-2X (Tabla IV), con β -mercaptoetanol 4 % (v/v) agregado en el momento. Luego, estas mezclas se calientan a 100 °C durante 5-10 minutos y se siembran en el gel utilizando una jeringa *Hamilton*. El volumen que se siembra de cada muestra está especificado en cada ensayo. En cada corrida es procesado paralelamente un patrón de pesos moleculares para determinar el peso aparente de cada banda. Usualmente es aplicado un voltaje constante, menor o igual a 100 V, y el tiempo de corrida se ajusta para que la integral del voltaje en función del tiempo sea 250 V h. Al finalizar la corrida los geles se tiñen con Coomassie Brilliant Blue R250 0.3 % en metanol:ácido acético:agua (3:1:6) y luego se decoloran con una solución de metanol:ácido acético:agua (3:1:6) hasta la visualización de las bandas. Después de ser teñidos, los geles se conservan en ácido acético 5 %.

2.III. Determinación de la localización de YLSCP2

La biomasa fue disuelta en Buffer LC y las bacterias fueron sonicadas (3 pulsos de 1 minuto a 0 °C). Como control de la fracción total (FT) fue tomada una alícuota de 100 μ L de esta suspensión. El resto de la solución fue centrifugada a 14000 $\times$ g durante 5 minutos

y el sobrenadante fue separado (FS, fracción soluble:) del precipitado (FI, fracción insoluble). Las fracciones FT y FS fueron diluidas al medio con Buffer SB-2X y la fracción FI fue disuelta con Buffer SB-2X diluido al medio. Estas muestras fueron analizadas mediante SDS-PAGE 10% a 100 V h durante 2 horas.

2.IV. Obtención de cuerpos de inclusión

Las bacterias se disuelven en 10 mL de Buffer LC por cada 5 g de biomasa y se realiza la ruptura celular aplicando una presión de 1000 psi (French Pressure Cell Press, Thermo IEC, Needham Heights, MA, USA). La solución obtenida se centrifuga ($12000 \times g$, 4 °C, 15 minutos) y se descarta el sobrenadante. El precipitado se disuelve en la mitad del volumen de Buffer LC usado en el primer paso y se agregan lisozima 0.2 mg/mL, DNAsa 0.01 mg/mL y $MgCl_2$ 10 mM. Esta solución se incuba durante 30 minutos a 37 °C, se centrifuga ($12000 \times g$, 4 °C, 15 minutos) y se conserva el precipitado. Este tratamiento con lisozima y DNAsa se repite una vez y luego el precipitado se disuelve en Buffer LC conteniendo Tritón® X-100 0.5 %. Esta solución se incuba 10 minutos a temperatura ambiente con agitación y se centrifuga ($12000 \times g$, 4 °C, 15 minutos). Finalmente se lava tres veces el precipitado con agua desionizada y los cuerpos de inclusión (CI) se almacenan a - 20 °C.

2.V. Purificación

Los CI se disuelven en 5 mL de Buffer A (Tabla IV) a 37 °C, con agitación suave, durante 1 hora. Luego se centrifuga ($12000 \times g$, 4 °C, 15 minutos) y se conserva la fracción soluble. La purificación de YLSCP2 se realiza mediante cromatografía de intercambio iónico. La matriz SP Sepharose Fast-Flow (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) es acondicionada de acuerdo a las instrucciones del fabricante y luego es equilibrada con Buffer A. La fracción soluble de los cuerpos de inclusión se siembra en la matriz y luego la columna se percola con un gradiente de NaCl de 0 - 2 M. El contenido de proteínas en cada fracción es determinado por absorbancia a 280 nm y SDS-PAGE. Todas las fracciones que contienen YLSCP2 son combinadas para obtener una única muestra homogénea, la que se almacena a - 20 °C. Finalmente, una alícuota de esta muestra se dializa contra Buffer B (Tabla IV), utilizando una membrana de 10 kDa de corte (Pierce, Rockford, U.S.A.) y realizando 3 cambios de 1 litro de Buffer B a 4 °C, con 4 - 12 horas de incubación cada uno. El grado de pureza de la muestra final de YLSCP2 es analizado por SDS-PAGE.

En algunas preparaciones fue incorporado un paso adicional luego de la diálisis. Este consiste en una cromatografía de exclusión molecular en FPLC (Pharmacia, Uppsala,

Suecia) con una matriz Sephadex G-75 (GE, Pharmacia, Uppsala, Suecia), equilibrada en Buffer C (Tabla IV), utilizando un flujo de 8 mL/min. Antes y después de este paso la proteína se concentra (aproximadamente 10 veces) con dispositivos de concentración CENTRICON® o CENTRIPREP® (Millipore, Bedford, MA) con corte de 10000 Da.

2.VI. Espectrometría de masa y secuenciación de proteínas

Los experimentos de espectrometría de masa (ionización por electrospray, LCQ Duo Ion Trap) y secuenciación de proteínas (degradación de Edman, Applied Biosystem 477A) fueron realizados en el LANAIS-PRO, Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA-CONICET.

3. Caracterización estructural de YLSCP2

3.I. Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteína es determinada por absorción UV, utilizando un espectrofotómetro JASCO V-550 (Jasco Corp., Japón). El coeficiente de extinción de YLSCP2 ($\epsilon_{280} = 6986 \pm 41 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) fue determinado previamente [33], midiendo los espectros de absorbancia de la misma cantidad de proteína en condiciones nativas y en presencia de GuHCl 4 M. En condiciones desnaturizantes (GuHCl 4 M) los coeficientes de extinción de los aminoácidos libres y de residuos incorporados en proteínas son esencialmente idénticos, y se puede calcular la concentración de proteína con alta precisión. Con este dato se puede calcular el coeficiente de extinción de la proteína nativa utilizando la Ecuación 1, en la cual $\epsilon_{280, \text{GuHCl}}$ es el coeficiente de extinción molar de la proteína en GuHCl calculado a partir de tablas [106].

$$\frac{A}{\epsilon_{280}} = \frac{A_{\text{GuHCl}}}{\epsilon_{280, \text{GuHCl}}} \quad \text{Ecuación 1}$$

Los espectros de absorbancia de YLSCP2 se corrigen restando el espectro del buffer al espectro de proteína y eliminando la contribución de la luz dispersada elásticamente por la muestra. La luz dispersada (S) por partículas del tamaño y forma esperados para una proteína y sus agregados depende de la longitud de onda (λ) y de los parámetros a , b y c (Ecuación 2). El valor de c es exactamente igual a 4 para soluciones de moléculas de radio mucho menor que la longitud de onda absorbida [104]. El ajuste de la Ecuación 2 al

espectro entre 310 y 340 nm mediante regresión no lineal (Solver® Excel, Microsoft Corporation 1985-1999, USA) permite calcular una curva de dispersión para todos los puntos del intervalo experimental. Esta curva se resta al espectro para la corrección y el espectro obtenido se analiza a partir de su representación gráfica para evaluar la razonabilidad de las correcciones realizadas.

$$S = a + b\lambda^{-c} \quad \text{Ecuación 2}$$

3.II. Espectroscopia de Absorción-UV

El entorno conformacional de los residuos aromáticos de YLSCP2 fue estudiado mediante análisis de cuarta derivada de espectros de absorción UV [107]. Se realizaron series de 10 espectros entre 340 y 240 nm para cada muestra de proteína (0.5-2.0 mg/mL) y de 5 espectros para el blanco, utilizando una celda de cuarzo de 0.5 mL de capacidad. El espectrofotómetro fue programado en modo lento (velocidad de 40 nm/min), tomando datos cada 0.1 nm con un ancho de banda de 1.0 nm. Todos los espectros de cada serie fueron promediados y corregidos tanto por el blanco como por la dispersión de luz. El espectro fue escalado dividiendo por la concentración de proteína, de forma de obtener un resultado comparable entre experimentos y luego fue suavizado utilizando un polinomio de grado 4 y una ventana móvil de 30 puntos centrada en el valor calculado (filtro Savitzky-Golay) [205]. Los espectros de cuarta derivada se calculan mediante dos ciclos sucesivos de derivación de segundo orden [106] utilizando la Ecuación 3.

$$\frac{\Delta^2 A}{\Delta \lambda^2} = \frac{(A_{i+20} - 2A_i + A_{i-20})}{\Delta \lambda^2} \quad \text{Ecuación 3}$$

El espectro de absorción de la proteína desplegada (AD) fue simulado para compararlo con los espectros obtenidos. Para esto fueron combinados los espectros de fenilalanina (Phe), N-acetyltryptofanoamida (NATA) y N acetiltirosinamida (NAYA) de acuerdo con la proporción de los mismos en la secuencia aminoacídica de YLSCP2 (5 Phe, 1 Tyr, 1 Trp) [206].

3.III. Espectroscopia de Dicroísmo Circular

El contenido de estructura secundaria y terciaria de YLSCP2 fue analizado por espectroscopia de dicroísmo circular (CD) en el UV-lejano y en el UV-cercano [207]. Para esto fue utilizado un equipo JASCO J-810 (Jasco Corp. Japón) calibrado con ácido (+)-10-canforsulfónico de acuerdo a instrucciones de los fabricantes y equipado con un

sistema "Peltier" para la regulación de la temperatura (20 - 22 °C).

En el UV lejano (180 - 240 nm) fue utilizada una celda de 0.1 cm de camino óptico, 100 miligrados de sensibilidad, 20-50 nm/min de velocidad de barrido, 1 s de tiempo de integración espectral, y 1 nm de ancho de banda. La concentración de proteína utilizada se especifica en el texto correspondiente a cada ensayo.

En el UV cercano (240 - 340 nm) fue utilizada una celda de 1.0 cm de camino óptico, 5 miligrados de sensibilidad y 20-50 nm/min de velocidad de barrido. La absorción en esta región espectral es cerca de dos órdenes de magnitud menor que en el UV lejano, por lo que fue utilizada una concentración de proteína diez veces mayor, la cual se especifica en los resultados.

Rutinariamente, se realizan aproximadamente cinco espectros de CD para cada muestra, los cuales se promedian, se corrigen por actividad dicróica del blanco, se ajusta la línea de base utilizando como cero el valor promedio de la lectura entre 320-340 nm y finalmente se realiza un suavizado mediante filtro Savitzky-Golay de cuarto grado, con una ventana de diez puntos [205].

La elipticidad molar es calculada aplicando la Ecuación 4, donde $[\theta]$ es la elipticidad molar ($\text{grados cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$), θ es la elipticidad en miligrados, n el número de enlaces peptídicos de la proteína (número de residuos menos uno), $[c]$ la concentración molar de proteína y l es el camino óptico de la celda en centímetros.

$$[\theta] = \frac{\theta}{10[c]nl} \quad \text{Ecuación 4}$$

El contenido de estructura secundaria es estimado a partir de los espectros de elipticidad molar en el UV-lejano utilizando el programa DICROPROT 2000 1.0.4 (G. Deleage, Institut de Biologie et Chimie des Protéines, Francia) [108].

3.IV. Espectroscopia de Fluorescencia

La fluorescencia estática del triptofano fue medida con un espectrofluorómetro K2 ISS (ISS, Champaign, IL, EE. UU.) que posee un canal de referencia que mide la emisión de una solución de rodamina. Las soluciones de proteína fueron utilizadas a una concentración menor a 15 μM (absorbancias menores a 0.1) para disminuir el efecto de filtro interno. Los espectros de emisión de fluorescencia de YLSCP2 fueron medidos con la proteína en su forma nativa (en Buffer B) y desplegada (en GuHCl 5 - 7 M o urea 0 - 7 M). La longitud de onda de excitación fue utilizada en el rango de 280 - 295 nm para el triptofano y entre 270 - 275 nm para tirosina. Los datos fueron adquiridos con

intervalos de 1 nm entre 250 - 450 nm y un ancho de banda de 4 nm (tanto en el canal de excitación como en el de emisión), manteniendo la temperatura a 20 °C con un termostato. La señal de fluorescencia final (F) fue calculada corrigiendo la señal original (f_i) por la intensidad de la referencia en cada punto (R_i) y la inicial (R_0) (Ecuación 5).

$$F = \frac{(f_i \times R_0)}{R_i} \quad \text{Ecuación 5}$$

3.V. Atenuación de la fluorescencia de triptofano

La accesibilidad del solvente al triptofano fue analizada mediante atenuación de la fluorescencia con acrilamida. Para esto, fue utilizada una solución de YLSCP2 ~ 5 µM sobre la cual fueron agregadas cantidades crecientes de una solución de acrilamida 4 M (preparada en Buffer B). La fluorescencia del triptofano fue determinada según lo descrito anteriormente, incubando unos minutos luego del agregado de acrilamida. El mismo procedimiento fue realizado con una solución de NATA ~ 5 µM, como control de un triptofano completamente expuesto al solvente. El efecto de filtro interno de la acrilamida fue corregido aplicando la Ecuación 6, donde ϵ_{295} es el coeficiente de extinción molar de acrilamida a 295 nm ($\epsilon_{295} = 0.23 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), F_C es la fluorescencia corregida, F es la fluorescencia experimental, y $[A]$ es la concentración de acrilamida [116].

$$F_C = F \times 10^{\left(\frac{[A] \times \epsilon_{295}}{2}\right)} \quad \text{Ecuación 6}$$

El mecanismo de atenuación de la fluorescencia puede ser "colisional" (atenuación por colisiones), estático (atenuación por asociación) o una combinación de ambos. La ecuación de Stern-Volmer (Ecuación 7) describe la atenuación de la fluorescencia en función de un agente atenuador [116]. Esta ecuación muestra que la relación entre la fluorescencia inicial (F_0) y la fluorescencia en presencia del agente atenuador (F_Q) varía de forma lineal con la concentración de agente atenuador $[Q]$ y la constante de atenuación (K_{SV}). Sin embargo, la ecuación de Stern-Volmer puede describir tanto el mecanismo "colisional" ($K_{SV} = K_D$) como el estático ($K_{SV} = K_S$). Para diferenciar entre estos mecanismos es necesario estudiar la dependencia de las constantes con la temperatura.

$$\frac{F_0}{F_Q} = 1 + K_{sv}[Q] \quad \text{Ecuación 7}$$

En el caso de estar presentes simultáneamente ambos mecanismos el modelo incluye las dos constantes de atenuación (Ecuación 8). Esta ecuación puede ser modificada para separar gráficamente las constantes, reorganizando y definiendo la constante aparente (K_{ap}). El gráfico de K_{ap} en función de Q es una línea recta con una pendiente de $K_D K_S$ y ordenada al origen igual a $K_D + K_S$. A partir de esta recta se pueden calcular las constantes, pero sin información adicional no es posible identificar cual corresponde a cada mecanismo.

$$\begin{aligned} \frac{F_0}{F_Q} &= (1 + K_D[Q])(1 + K_S[Q]) \\ \frac{F_0}{F_Q} &= 1 + (K_D + K_S + K_D K_S[Q])[Q] \\ \frac{F_0}{F_Q} &= 1 + K_{ap}[Q] \\ K_{ap} &= \left(\frac{F_0}{F_Q} - 1 \right) \frac{1}{[Q]} = (K_D + K_S) + K_D K_S[Q] \end{aligned} \quad \text{Ecuación 8}$$

La presencia o ausencia de linealidad en un gráfico de F_0/F_Q versus $[Q]$ permite discernir entre los modelos simples (colisional o estático) y el combinado (ambos mecanismos).

3.VI. Anisotropía de fluorescencia de triptofano

Los ensayos de anisotropía de fluorescencia de triptofano fueron realizados en un espectrofluorómetro K2 ISS (ISS, Champaign, IL, EE. UU.), utilizando polarizadores para la excitación y la emisión. El formato de detección fue tipo "L", sin monocromador en el canal de emisión. El funcionamiento de los polarizadores fue controlado midiendo la anisotropía de una solución de glicógeno (absorbancia 0.08). Para eliminar la señal correspondiente a la dispersión de luz fue utilizado el filtro WG320 (corte en 320 nm). La longitud de onda de excitación fue seleccionada según el ensayo, para la excitación del triptofano se ensayaron longitudes de onda desde 250 a 300 nm. La concentración de proteína usada fue entre 5 - 20 μM , excepto cuando se estudió la variación de la anisotropía como función de la concentración de proteína (0 - 250 μM). La relación exacta entre la intensidad de fluorescencia paralela ($I_{||}$) y la vertical ($I_{\perp}$) fue calculada

determinando el factor "G", a partir de la relación entre la sensibilidad de detección para la luz polarizada paralela y verticalmente ($G = S_V / S_H$). La anisotropía de la muestra fue calculada utilizando los $I_{\parallel}$ y $I_{\perp}$ (Ecuación 9)

$$A = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2 I_{\perp}} \quad \text{Ecuación 9}$$

La evolución de la anisotropía de emisión de triptofano en YLSCP2 fue estudiada en función de la viscosidad, variando la viscosidad con el agregado de sacarosa 2.5 M (Anedra) en Buffer B [208]. Según indica la ecuación de Perrin (Ecuación 10), la anisotropía basal (A_0) y la anisotropía medida (A) están relacionadas con el tiempo de vida del estado excitado del fluoróforo (τ) y el tiempo de correlación rotacional (θ) o el coeficiente de difusión rotacional (D) [116]. El tiempo de correlación rotacional depende de la viscosidad del medio (η), del volumen de la unidad rotacional (V), de la temperatura (T) y de la constante de Boltzman (k).

$$A = \frac{A_0}{1 + \frac{\tau}{\theta}} \quad \theta = \frac{\eta V}{kT} \quad \text{Ecuación 10}$$

A partir de estas ecuaciones es posible determinar el volumen aparente de la proteína midiendo la anisotropía a diferentes viscosidades. El ajuste de una versión modificada de la ecuación de Perrin (Ecuación 11) por regresión no lineal permite determinar los parámetros A_0 y C [117]. Finalmente, el volumen de la proteína es calculado utilizando la Ecuación 12. En el caso de YLSCP2 fue utilizado un valor de tiempo de vida del estado excitado del fluoróforo estimando de 3 ns.

$$A = \frac{A_0}{\eta + \frac{\tau k T}{\eta V}} = \frac{\eta A_0}{\eta + C} \quad \text{Ecuación 11}$$

$$V = \frac{\tau k T}{C} \quad \text{Ecuación 12}$$

3.VII. Comportamiento hidrodinámico

El radio de Stokes (R_S) de YLSCP2 fue determinado mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC). Para esto fue utilizado un equipo para cromatografía líquida rápida de proteínas y péptidos (FPLC) equipado con una cámara de inyección de 100 μ L, una columna de Superose 12[®] y un detector de longitud de onda fija UV a 280 nm (Pharmacia, Uppsala, Suecia). La columna fue calibrada inyectando una mezcla de proteínas globulares de peso molecular conocido (tiroglobulina: 670 kDa, globulina bovina: 150 kDa, ovoalbumina de gallina: 44 kDa, mioglobina equina: 17 kDa y vitamina B12: 1.35 kDa). El R_S de YLSCP2 fue calculado a partir de su peso molecular (PM) aplicando la

Ecuación 13 [110][209].

$$\log(R_s) = 0.369 \log(PM) - 0.254 \quad \text{Ecuación 13}$$

En otro ensayo fue utilizado un cromatógrafo FPLC equipado con una columna Superdex 200 (GE healthcare) y detectores de dispersión de luz dinámico y estático (miniDAWN, Wyatt Technology Corp., Santa Barbara, CA). La muestra de proteína utilizada fue 3.5 mg/mL y el flujo fue de 0.4 mL/min. A partir del resultado obtenido fueron calculados el peso molecular, el coeficiente de difusión traslacional y el radio de giro del pico de interés, utilizando el software provisto por el equipo (Astra).

3.VIII. Dispersión de rayos-X a bajo ángulo

La dispersión de rayos-X a bajo ángulo de YLSCP2 fue medida en la línea D11A-SAXS del Laboratorio Nacional de Luz Sincrotrón (LNLS), Campinas, Brasil. El haz de fotones focalizado ($1 \times 0.2 \text{ mm}^2$ en la muestra) y monocromático (longitud de onda de 1.488 Å) fue obtenido con un monocromador con focalización horizontal y un espejo para focalización vertical. Las celdas utilizadas fueron capilares de cuarzo de 1 mm de camino óptico para rayos-X con un volumen total de 80 µL. Para cada muestra fueron realizados al menos tres mediciones independientes, alternando blancos antes y después de cada serie de espectros. La concentración de proteína y las condiciones de la muestra se describen en la sección correspondiente. Las correcciones por la intensidad del haz, la homogeneidad del detector y la absorción de la muestra fueron realizadas siguiendo procedimientos estándar.

El radio de giro de YLSCP2 (R_G) fue calculado a partir de la intensidad de dispersión de rayos X (I) en función del vector de dispersión (Q) según la "aproximación de Guinier" (Ecuaciones 14-16) o mediante la función de distribución de pares de distancias que se obtiene mediante una Transformada Regularizada de *Fourier* usando el programa GNOM 4.5 [210].

$$\ln(I) = \ln(I_0) - \frac{R_G^2 Q^2}{3} \quad \text{Ecuación 14}$$

$$Q = 4\pi \frac{\sin(\theta)}{\lambda} \quad \text{Ecuación 15}$$

$$R_G \times Q \leq 1.0 \quad \text{Ecuación 16}$$

La "globularidad" de YLSCP2 fue determinada según "el gráfico de Kratky" ($I(Q) \times Q^2$ versus Q). Las curvas SAXS fueron simuladas utilizando el programa CRY SOL 2.6 [210]. El análisis de componentes principales (PAC) de los espectros de SAXS en función de la concentración de YLSCP2 fue realizado utilizando el programa sixPACK (Sam Webb, Stanford Synchrotron Radiation Laboratory) [114].

3.IX. Entrecruzamiento

Los ensayos de entrecruzamiento fueron realizados con glutaraldehído (Fluka) y con disuccinimidil suberato (DSS, Pierce). En ambos casos las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE 10 %, sembrando una masa de proteína idéntica en cada calle del gel. La reacción con glutaraldehído fue realizada con muestras de proteína entre 0.5 - 3.5 mg/mL y glutaraldehído 0.2 - 0.5 %, incubando entre 2 - 30 minutos y frenando la reacción con Buffer SB-2X. El control de reacción fue realizado agregando Buffer SB-2X antes de agregar glutaraldehído. La reacción con DSS fue realizada con muestras de proteína (0.25 - 3 mg/mL) en Buffer B y DSS en un exceso molar de 50 veces. Luego de una incubación durante 30 minutos a temperatura de ambiente la reacción fue frenada con el agregado de $\frac{1}{4}$ de volumen de Buffer SB-4X. El control de reacción fue preparado agregando Buffer SB-4X antes de agregar DSS.

3.X. Bioinformática

El análisis bioinformático de las secuencias SCP2 fue realizado utilizando los programas Clustal 2.0.12 (D. Higgins, J. Thompson y T. Gibson) y BLAST 2.0 (Basic Local Alignment Search Tool, NCBI, EE.UU.).

El modelo estructural para YLSCP2 fue generado con el programa 3D-JIGSAW 2.01 [120], utilizando como patrón de homología la estructura reportada para SCP2 de conejo (cSCP2, 1C44). La calidad estructural del modelo obtenido fue verificada utilizando el programa PROCHECK v.3.5.4 (European Bioinformatics Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge, United Kingdom) [211]. La visualización y representación de las estructuras fueron realizadas con el programa Swiss-Pdb Viewer 3.7 (Glaxo Wellcome Experimental Research). El área superficial accesible al solvente (ASA) fue calculada utilizando los algoritmos reportados en la referencia [212]. El desplazamiento cuadrático medio (RMSD) entre YLSCP2, SCP2 de conejo (cSCP2, 1C44, [86]), SCP2 de mosquito

(AeSCP2, 1PZ4, [90]), y SCP2 de la enzima MFE2 de humanos (mfe2hSCP2, 1IKT, [89]) fue calculado usando los átomos correspondientes a las α -hélices y hojas- β conservadas (56% del total de los átomos de la cadena principal) con el programa Swiss-Pdb Viewer 3.7.

4. Caracterización termodinámica de YLSCP2

4.I. Desnaturalización inducida por temperatura

El desplegado de YLSCP2 en función de la temperatura fue seguido mediante dicroísmo circular (CD) a 220 nm, utilizando una celda de 1 cm de camino óptico y una sensibilidad de 100 miligrados. La muestra fue equilibrada a 4 - 10 °C y luego llevada hasta 85 - 95 °C a una velocidad de calentamiento constante de 2 °C/min. Los parámetros termodinámicos fueron calculados utilizando la Ecuación 17, donde $\Delta G(T)$ es la energía libre de desplegado a la temperatura T , ΔC_P es el cambio en la capacidad calorífica a presión constante, T_G es la temperatura a la cual $\Delta G(T)$ es igual a cero y $\Delta H(T_G)$ es el cambio de entalpía a la temperatura T_G .

$$\Delta G(T) = \Delta H_{T_G} + \Delta C_P (T - T_G) - T \left[\frac{\Delta H_{T_G}}{T_G} + \Delta C_P \ln \left(\frac{T}{T_G} \right) \right] \quad \text{Ecuación 17}$$

Los ensayos de desnaturalización de YLSCP2 fueron realizados a diferentes valores de pH (5.0, 7.0 y 9.0). La Ecuación 17 fue ajustada por regresión no lineal utilizando todas las transiciones a distintos pH. Existe una relación lineal entre ΔH y T_m cuya pendiente es ΔC_P [213], lo que permite utilizar un ΔC_P global para calcular simultáneamente ΔH de cada transición a diferente pH.

4.II. Desnaturalización inducida químicamente

Las muestras de proteína (~ 5 μ M) fueron preparadas agregando un volumen apropiado de urea 8 M para lograr la concentración de desnaturalizante deseada e incubando a 25 °C durante 24 horas. El proceso de desplegado de la estructura terciaria fue seguido mediante la emisión de fluorescencia de triptofano luego de excitar a 290 nm. El centro de masa de los espectros (CM) fue calculado a partir de las longitudes de onda (λ_i) y las señales (Fi), según la Ecuación 18.

$$CM = \frac{\sum (\lambda_i \times F_i)}{\sum (F_i)} \quad \text{Ecuación 18}$$

La pérdida de estructura secundaria debido al proceso de desplegado fue determinada midiendo los espectros de CD en el UV-lejano, acorde a lo detallado anteriormente.

La unión de la sonda fluorescente ácido 1-anilinaftalen-8-sulfónico (ANS) en función de la concentración de urea fue determinada agregando un exceso de ANS en las muestras e incubando ~ 3 horas. Los espectros de emisión de ANS fueron medidos desde 300 nm hasta 600 nm luego de aplicar una longitud de onda de excitación de 350 nm.

Las muestras de YLSCP2 ~ 230 µM utilizadas para medir SAXS fueron preparadas agregando urea en forma sólida y registrando los cambios de volumen para corregir la concentración final de proteína. Estas muestras fueron incubadas durante ~ 12 horas a temperatura de ambiente. Los espectros de SAXS fueron adquiridos como fue descripto anteriormente.

Con el fin de obtener una idea cuantitativa del número de estados termodinámicos independientes accesibles al sistema a diferentes concentraciones de caótrolo, fue aplicada una versión ligeramente modificada del método de diagrama de fases [214] (Ecuaciones 19-25). Estas ecuaciones se basan en que cualquier señal espectroscópica (*S*) puede ser representada como una combinación lineal de componentes del espectro. Está demostrado que para una transición entre dos conformaciones el gráfico de la intensidad a la longitud de onda 1 (*S*_{λ1}) versus la intensidad a la longitud de onda 2 (*S*_{λ2}) debe ser lineal y depende de las fracciones molares de las especies (*α*). Si se utilizan dos señales espectroscópicas independientes (*D* y *F*) debe ocurrir lo mismo (Ecuaciones 19-25).

$$D(\lambda_1) = \alpha D_a(\lambda_1) + (1 - \alpha) D_b(\lambda_1) \quad \text{Ecuación 19}$$

$$F(\lambda_2) = \alpha F_a(\lambda_2) + (1 - \alpha) F_b(\lambda_2) \quad \text{Ecuación 20}$$

$$\alpha = \frac{D(\lambda) - D_b(\lambda_1)}{D_a(\lambda_1) - D_b(\lambda_1)} \quad \text{Ecuación 21}$$

$$F(\lambda_2) = F_a(\lambda_2) \left[\frac{D(\lambda) - D_b(\lambda_1)}{D_a(\lambda_1) - D_b(\lambda_1)} \right] + F_b(\lambda_2) \left[1 - \frac{D(\lambda) - D_b(\lambda_1)}{D_a(\lambda_1) - D_b(\lambda_1)} \right] \quad \text{Ecuación 22}$$

$$F(\lambda_2) = c + d D(\lambda_1) \quad \text{Ecuación 23}$$

$$c = \frac{F_b(\lambda_2)[D_a(\lambda_1) - 2D_b(\lambda_1)] - F_a(\lambda_2)D_b(\lambda_1)}{D_a(\lambda_1) - D_b(\lambda_1)} \quad \text{Ecuación 24}$$

$$d = \frac{F_a(\lambda_2) - F_b(\lambda_2)}{D_a(\lambda_1) - D_b(\lambda_1)} \quad \text{Ecuación 25}$$

Luego del análisis de los diagramas de fase fue seleccionado un modelo de desplegado de tres estados $N \leftrightarrow I \leftrightarrow U$ para el ajuste [213] (Ecuaciones 26-35).

$$N \leftrightarrow I \leftrightarrow U \quad \text{Ecuación 26}$$

$$f_N + f_I + f_U = 1 \quad \text{Ecuación 27}$$

$$K_{NI} = \frac{I}{N} = \frac{f_I}{f_N} \quad K_{IU} = \frac{U}{I} = \frac{f_U}{f_I} \quad K_{NU} = \frac{U}{N} = \frac{f_U}{f_N} = K_{NI} K_{IU} \quad \text{Ecuación 28}$$

$$f_N + f_N K_{NI} + f_N K_{NI} K_{IU} = 1 \quad f_N = \frac{1}{1 + K_{NI} + K_{NI} K_{IU}} \quad \text{Ecuación 29}$$

$$\frac{f_I}{K_{NI}} + f_I + f_I K_{IU} = 1 \quad f_I = \frac{K_{NI}}{1 + K_{NI} + K_{NI} K_{IU}} \quad \text{Ecuación 30}$$

$$\frac{f_U}{K_{NI} K_{IU}} + \frac{f_U}{K_{IU}} + f_U = 1 \quad f_U = \frac{K_{NI} K_{IU}}{1 + K_{NI} + K_{NI} K_{IU}} \quad \text{Ecuación 31}$$

$$K_{NI} = e^{\left(\frac{-\Delta G_{NI}}{RT}\right)} \quad K_{IU} = e^{\left(\frac{-\Delta G_{IU}}{RT}\right)} \quad \text{Ecuación 32}$$

$$\Delta G_{NI} = \Delta G_{NI}^0 - m_{NI} D = m_{NI} (C_{m_{NI}} - D) \quad \text{Ecuación 33}$$

$$\Delta G_{IU} = \Delta G_{IU}^0 - m_{IU} D = m_{IU} (C_{m_{IU}} - D) \quad \text{Ecuación 34}$$

$$S = f_N (S_{0N} + S_N D) + f_I (S_{0I} + S_I D) + f_U (S_{0U} + S_U D) \quad \text{Ecuación 35}$$

En estas ecuaciones f_N , f_I and f_U son las fracciones molares de los estados nativo, intermediario y desplegado, respectivamente, K_{ab} es la constante de equilibrio (donde "ab" es NI o IU, según corresponda), D es la concentración de desnaturalizante, C_m es la concentración de desnaturalizante a la cual ΔG es cero, m es la pendiente de la dependencia lineal de ΔG con la concentración de desnaturalizante, S_{0N} , S_{0I} y S_{0U} son los valores de fluorescencia, centro de masa o elipticidad (según el caso) para cada estado extrapolando a concentración de desnaturalizante igual a cero, para el estado nativo, intermediario y desplegado, S_N , S_I y S_U es la dependencia de la señal con el desnaturalizante (para cada estado) y S es la señal de la sonda correspondiente.

Este modelo fue ajustado de forma múltiple a la intensidad de fluorescencia de triptofano a 326 nm, el centro de masa de los espectros de fluorescencia de triptofano, la fluorescencia de ANS a 480 nm y la elipticidad molar a 220 nm. Para esto se utilizaron C_m y m como parámetros comunes para todas las sondas, mientras que los parámetros de las señales fueron específicos para cada una de ellas.

5. Caracterización Funcional de YLSCP2

5.1. Modelo para un sitio de unión

La unión de ligandos a YLSCP2 fue analizada aplicando un modelo de un sitio único de unión (Ecuaciones 36-40) [215]. En este modelo, una molécula de ligando (L) se une a una molécula de proteína (P), con una constante de disociación K_D (Ecuación 36). La concentración de proteína ($[P]$) y de ligando ($[L]$) en el equilibrio están definidas en las Ecuaciones 37-38, donde $[PL]$ es la concentración de complejo proteína-ligando, mientras que $[P_0]$ y $[L_0]$ son las concentraciones iniciales de proteína y ligando respectivamente.

$$P + L \rightleftharpoons PL \quad K_D = \frac{[P][L]}{[PL]} \quad \text{Ecuación 36}$$

$$[P] = [P_0] - [PL] \quad \text{Ecuación 37}$$

$$[L] = [L_0] - [PL] \quad \text{Ecuación 38}$$

Reemplazando las ecuaciones 37-38 en la ecuación de la constante de disociación (Ecuación 36) y despejando $[PL]$, se obtiene una ecuación cuadrática (Ecuación 39).

$$[PL]^2 - ([P_0] + [L_0] + K_D)[PL] + [P_0][L_0] = 0 \quad \text{Ecuación 39}$$

La raíz de esta cuadrática (Ecuación 40) que tiene sentido físico permite calcular la concentración de complejo.

$$PL = \frac{(P_0 + L_0 + K_D) - \sqrt{(P_0 + L_0 + K_D)^2 - 4P_0 L_0}}{2} \quad \text{Ecuación 40}$$

5.II. Unión de ligandos fluorescentes

Para los ligandos intrínsecamente fluorescentes fue utilizada la metodología que se describe a continuación. Los espectros de fluorescencia fueron realizados con una cubeta de 1.0-cm de camino óptico, un termostato a 20 °C y un espectrofluorómetro K2 ISS (ISS, Champaign, IL, EE. UU.). Las muestras fueron preparadas en Buffer B, y la titulación de proteína con ligando o viceversa fue seguida por la fluorescencia propia del ligando luego de incubar al menos 2 minutos. Los detalles específicos para cada ligando se describen a continuación.

La solución de ácido *cis*-parinárico (AP, Molecular Probes) fue preparada en etanol y su concentración fue determinada por absorbancia ($\epsilon_{304\text{nm}} = 78000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [176]. Para la titulación de YLSCP2 $\sim 1 \mu\text{M}$ fue utilizada una dilución en Buffer B del AP de concentración no mayor a $150 \mu\text{M}$. Los espectros de fluorescencia de AP fueron medidos luego de excitar con una longitud de onda de 307 nm y la titulación fue seguida por el cambio en la emisión de fluorescencia de AP a una longitud de onda de 410 nm.

El ácido 1-anilinaftalen-8-sulfónico (ANS, Molecular Probes) fue disuelto en Buffer B y su concentración fue determinada por absorbancia ($\epsilon_{350\text{nm}} = 4950 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [216]. La unión de ANS a YLSCP2 fue realizada titulando de forma directa (YLSCP2 $\sim 2 \mu\text{M}$ + alícuotas de ANS $\sim 300 \mu\text{M}$) e indirecta (ANS $2 - 10 \mu\text{M}$ + alícuotas de YLSCP2 $\sim 50 - 350 \mu\text{M}$). La unión fue determinada siguiendo la emisión de fluorescencia del ANS a una longitud de onda de 480 nm luego de excitar con una longitud de onda de 350 nm.

El dehidroergosterol (DHE, Sigma-Aldrich) fue disuelto en etanol y su concentración fue determinada por absorbancia ($\epsilon_{324\text{nm}} = 11,250 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [134]. La unión de DHE a YLSCP2 fue seguida por fluorescencia luego de excitar con una longitud de onda de excitación de 324 nm.

La solución de merocianina 540 (MC, Sigma-Aldrich) fue preparada diluyendo una solución concentrada (1.75 mM) en Buffer B. La titulación de una muestra de MC $\sim 2 \mu\text{M}$ con YLSCP2 fue seguida por la emisión de fluorescencia de MC540 entre 500-650 nm luego de excitar con una longitud de onda de 530 nm.

En todos los casos, la señal medida está relacionada con la concentración de complejo proteína-ligando ($[PL]$) y de ligando libre por la Ecuación 41, donde $[L_0]$ es la concentración de ligando total, mientras que Y_L y Y_{PL} son los rendimientos cuánticos del ligando libre y del complejo, respectivamente.

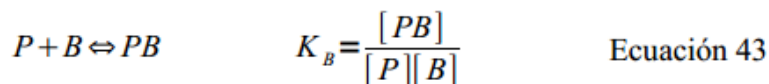
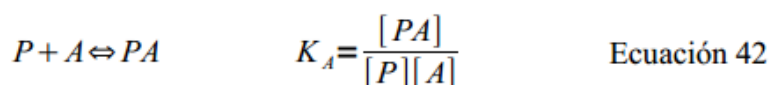
$$Y = Y_L([L_0] - [PL]) + Y_{PL}[PL] \quad \text{Ecuación 41}$$

Asumimos que la unión se describe mediante un modelo de un sitio de unión para obtener la concentración de complejo ($[PL]$) y calculamos la constante de disociación para cada ligando por regresión no lineal, analizando al menos 3 ensayos independientes.

5.III. Desplazamiento de ácido *cis*-parinámico

En los ensayos de desplazamiento de AP unido a YLSCP2 por el agregado de otro ligando siempre fue preparada una solución del complejo YLSCP2-AP en relación 1:1 (~ 2 μM). Esta solución fue titulada con una solución concentrada del ligando correspondiente (100-900 μM), dejando reaccionar unos minutos antes de medir. El desplazamiento fue seguido por la intensidad de emisión de fluorescencia de AP a una longitud de onda de 410 nm luego de aplicar una longitud de onda de excitación de 307 nm. Los ligandos utilizados fueron ANS, pCoA, palmitato, DPP, EPC y colesterol.

Los datos obtenidos fueron analizados asumiendo un sitio único de unión. Cuando dos ligandos diferentes (A y B) compiten por un sitio de unión en la proteína (P), entran en juego dos constantes de asociación (K_A y K_B), (Ecuaciones 42-43) donde $[P]$, $[A]$, $[B]$, $[PA]$ y $[PB]$ son las concentraciones de proteína, ligando A, ligando B, complejo proteína-ligando A y complejo proteína-ligando B, respectivamente [217].



Por conservación de masas se obtienen las ecuaciones necesarias para calcular las concentraciones de ligando A, ligando B y proteína en el equilibrio (Ecuaciones 44-46).

$$[A] = [A_0] - [PA] \quad \text{Ecuación 44}$$

$$[B] = [B_0] - [PB] \quad \text{Ecuación 45}$$

$$[P] = [P_0] - [PA] - [PB] \quad \text{Ecuación 46}$$

Reemplazando las ecuaciones 44-46 en las ecuaciones 42-43 se obtienen las ecuaciones para [PA] y [PB], con las que luego se obtiene una ecuación cúbica para la concentración de proteína reemplazando en la ecuación de masa para la proteína (Ecuación 47).

$$[P]^3 + a[P]^2 + b[P] + c = 0$$

$$a = K_A + K_B + [A_0] + [B_0] - [P_0]$$

$$b = K_B([A_0] - [P_0]) + K_A([B_0] - [P_0]) + K_A K_B$$

$$c = -K_A K_B [P_0]$$

Ecuación 47

A partir de la única solución con sentido físico para esta ecuación cúbica (Ecuación 48) se obtienen las expresiones para [PA] (Ecuación 49) y [PB] (Ecuación 50).

$$[P] = -\frac{a}{3} + \frac{2}{3} \sqrt{(a^3 - 3b)} \cos\left(\frac{\theta}{3}\right)$$

$$\theta = \arccos\left(\frac{-2a^3 + 9ab - 27c}{2\sqrt{(a^2 - 3b)^3}}\right)$$

Ecuación 48

$$[PA] = \frac{[A_0] \left(2\sqrt{(a^2 - 3b)} \cos\left(\frac{\theta}{3}\right) - a \right)}{3K_A + \left(\sqrt{(a^2 - 3b)} \cos\left(\frac{\theta}{3}\right) - a \right)}$$

Ecuación 49

$$[PB] = \frac{[B_0] \left(2\sqrt{(a^2 - 3b)} \cos\left(\frac{\theta}{3}\right) - a \right)}{3K_B + \left(\sqrt{(a^2 - 3b)} \cos\left(\frac{\theta}{3}\right) - a \right)}$$

Ecuación 50

La señal de fluorescencia observada (Y) depende de la concentración de complejo y de ligando libre según la Ecuación 51, donde Y_{PA} , Y_{PB} y Y_A son los rendimientos cuánticos del complejo PA, PB y del ligando libre A, respectivamente.

$$Y = Y_{PA}[PA] + Y_A([A]_0 - [PA]) + Y_{PB}[PB] + Y_B([B]_0 - [PB])$$

Ecuación 51

La constante de disociación para el ligando B se obtiene ajustando la Ecuación 51 a los resultados experimentales mediante regresión no lineal (Solver, Excel).

En el caso que este modelo no ajuste de forma adecuada a los datos experimentales, la afinidad (K_i) se estima calculando la concentración de ligando necesaria para desplazar un 50 % de AP (IC50) a partir de la Ecuación 52 [218].

$$K_i = \frac{[IC50]}{1 + \frac{[L]}{K_L}}$$

Ecuación 52

5.IV. Unión de ligandos seguida por atenuación de la fluorescencia

La solución de palmitoil-Coenzima A (pCoA, Fluka) fue preparada disolviendo el lípido en Buffer B y la concentración fue determinada midiendo espectros de absorbancia UV ($\epsilon_{260\text{nm}} = 14,700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [219]). La titulación de YLSCP2 $\sim 5 \mu\text{M}$ con pCoA $\sim 2 \text{ mM}$ fue realizada incubando al menos 2 minutos luego del agregado de cada alícuota. La unión fue seguida por la emisión de fluorescencia de triptofano a 326 nm luego de aplicar una excitación a 294 nm. La Ecuación 53 fue ajustada a la señal experimental mediante regresión no lineal, asumiendo un modelo de un sitio de unión. En esta ecuación la señal depende de las señales de la proteína libre y del complejo (YP y YPL) y de la concentración de proteína total ($[P_0]$).

$$Y = Y_P([P_0] - [PL]) + Y_{PL}[PL] \quad \text{Ecuación 53}$$

5.V. Cambios de Anisotropía debidos a la unión de ligandos

Los ensayos de anisotropía fueron realizados como fue descripto anteriormente. La contribución de la dispersión de luz fue eliminada utilizando los filtros WG320 (corte en 320 nm) o KV408 (corte en 408 nm), según fuera necesario. La longitud de onda de excitación utilizada fue entre 250-300 nm para excitar triptofano y para los ligandos fue utilizada la longitud de onda de excitación específica para cada uno. Los resultados fueron analizados aplicando las ecuaciones 54-60 [220]. Los valores de anisotropía de la especie libre (A_l) y unida (A_u) se calculan a partir de la intensidad paralela ($I_{\parallel}$) y vertical ($I_{\perp}$) obtenida para cada especie (Ecuaciones 54 y 55). La intensidad total de fluorescencia de cada especie está relacionada con su fracción molar (χ) y su rendimiento cuántico (q).

$$A = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2 I_{\perp}} \quad \text{Ecuación 54}$$

$$A_l = \frac{I_{l\parallel} - I_{l\perp}}{I_{l\parallel} + 2 I_{l\perp}} \quad I_l = I_{l\parallel} + 2 I_{l\perp} = q_l \chi_l \quad \text{Ecuación 55}$$

$$A_u = \frac{I_{u\parallel} - I_{u\perp}}{I_{u\parallel} + 2 I_{u\perp}} \quad I_u = I_{u\parallel} + 2 I_{u\perp} = q_u \chi_u \quad \text{Ecuación 56}$$

La anisotropía promedio ($\bar{A}$) obtenida durante la titulación es una combinación de los valores de anisotropía y las intensidades de fluorescencia de cada especie

(Ecuación 56).

$$\bar{A} = \frac{A_l I_l + A_u I_u}{I_l I_u} = \frac{A_l (1 - X_u) q_l + A_u X_u q_u}{X_u q_u + (1 - X_u) q_u} \quad \text{Ecuación 57}$$

La relación entre los rendimientos cuánticos de cada especie (cuando su fracción molar es 1) se define como la constante R para simplificar los cálculos (Ecuación 57).

$$R = \frac{q_u}{q_l} = \frac{(I_{\parallel} + 2 I_{\perp})_u}{(I_{\parallel} + 2 I_{\perp})_l} \quad \text{Ecuación 58}$$

Incorporando las fracciones molares en la Ecuación 56 se obtiene una relación entre la anisotropía promedio y las fracciones molares de las dos especies (Ecuación 59) o sólo una especie (Ecuación 60). La constante de disociación se obtiene mediante un ajuste por regresión no lineal de la Ecuación 60 a los resultados experimentales (Solver, Excel), usando el modelo de un sitio de unión para calcular la concentración de complejo.

$$\bar{A} = \frac{A_l (1 - X_u) + A_u R X_u}{X_u R + 1 - X_u} \quad \text{Ecuación 59}$$

$$\bar{A} = \frac{(R A_u - A_l) X_u + A_l}{(R - 1) X_u + 1} \quad \text{Ecuación 60}$$

5.VI. Unión de ligandos seguida por ITC

Los ensayos de calorimetría de titulación isotérmica (ITC) fueron realizados en un equipo *nano*-ITC (Calorimetry Sciences Corporation). Antes de iniciar el ensayo las soluciones de ligando y proteína fueron desgaseadas aplicando vacío. Luego, fue colocado 1 mL de ligando ~ 10 µM en la celda y 250 µL de proteína ~ 200 µM en la jeringa. La estabilización de la línea de base fue alcanzada después de 3 horas de incubación y entonces fue iniciada la titulación.

El resultado fue analizado aplicando un modelo de múltiples sitios de unión idénticos (Ecuación 61), donde Q es calor total, V es el volumen de la celda, ΔH es la entalpía de unión, K es la constante de unión, n es el número de sitios, [P] es la concentración de proteína y [L] es la concentración de ligando [221].

$$Q = V \Delta H \left([L] + \frac{1 + nK[P] - \sqrt{(1 + nK[P] - K[L])^2 + 4K[L]}}{2K} \right) \quad \text{Ecuación 61}$$

5.VII. Interacción con vesículas unilamelares pequeñas

La interacción entre YLSCP2 y vesículas unilamelares pequeñas (SUV) fue determinada mediante CD. Las vesículas de fosfatidil colina de huevo (EPC) 100 % se prepararon en Buffer E (Tabla IV), a una concentración entre 2.5 - 3 mM (gentilmente cedidas por el Dr. Lisandro J. Falomir-Lockhart). Los espectros de CD en el UV-cercano y lejano fueron medidos para muestras de YLSCP2 con el agregado de SUV a diferentes relaciones molares, luego de incubar durante 15 minutos.

5.VIII. Efecto de la unión de ligandos en la estructura de YLSCP2

El efecto de la unión de ligandos sobre la estructura de la proteína fue estudiado mediante CD, SAXS y fluorescencia de triptofano. Los ensayos correspondientes se realizaron según fue descrito anteriormente para cada técnica. El rango de concentraciones utilizado está debidamente reportado en los resultados. Los controles de los ligandos libres fueron realizados usando la misma concentración que en la muestra con proteína.

5.IX. Efecto de la unión de ligandos en la estabilidad de YLSCP2

La estabilidad de YLSCP2 en presencia de ligandos fue analizada mediante desplegado por temperatura seguido por CD. Los ensayos se realizaron como fue descrito anteriormente. Las concentraciones de ligando y proteína se mencionan en los resultados. La Ecuación 17 fue ajustada a los resultados mediante regresión no lineal (Solver, Excel) para obtener los parámetros de desplegado, asumiendo un modelo de dos estados.

Bibliografía

- [1] Hamilton J.A., Fatty acid transport: difficult or easy?, *Journal of Lipid Research*, 39, 467-81, 1998.
- [2] Noy N., Donnelly T.M., Zakim D., Physical-Chemical Model for the Entry of Water-Insoluble Compounds into Cells. Studies of Fatty Acid Uptake by the Liver, *Biochemistry*, 25, 2013-21, 1986.
- [3] Schaffer J.E., Fatty acid transport: the roads taken, *American Journal of Physiology and Endocrinology Metabolism*, 282, E239-46, 2002.
- [4] Daum G., Paltauf F., Lipid transport in microorganisms, *Experientia*, 46, 586-92, 1990.
- [5] Glatz J.F., van der Vusse G.J., Intracellular transport of lipids, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 88, 37-44, 1989.
- [6] Knudsen J., Acyl-CoA-binding protein (ACBP) and its relation to fatty acid-binding protein (FABP): an overview, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 98, 217-23, 1990.
- [7] Huuskonen J., Ehnholm C., Phospholipid transfer protein in lipid metabolism, *Current Opinion in Lipidology*, 11, 285-89, 2000.
- [8] Kader J.C., Lipid-transfer proteins in plants, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47, 627-54, 1996.
- [9] Seedorf U., Ellinghaus P., Roch Nofer J., Sterol carrier protein-2, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1486, 45-54, 2000.
- [10] Dell'Angelica E.C., Stella C.A., Ermácora M.R., Ramos E.H., Santomé J.A., Study on fatty acid binding by proteins in yeast. Dissimilar results in *Saccharomyces cerevisiae* and *Yarrowia lipolytica*, *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 102, 261-65, 1992.
- [11] Kragelund B.B., Knudsen J., Poulsen F.M., Acyl-coenzyme A binding protein

- (ACBP), *Biochimica et Biophys Acta*, 1441, 150-61, 1999.
- [12] Helmkamp G.M.Jr., Phospholipid Transfer Proteins: Mechanism of Action, *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 18, 71-91, 1986.
- [13] Edqvist J., Blomqvist K., Fusion and Fission, the Evolution of Sterol Carrier Protein-2, *Journal of Molecular Evolution*, 62, 292-306, 2006.
- [14] Wanders R.J., Vreken P., Ferdinandusse S., Jansen G.A., Waterham H.R., van Roermund C.W., Van Grunsven E.G., Peroxisomal fatty acid alpha- and beta-oxidation in humans: enzymology, peroxisomal metabolite transporters and peroxisomal diseases, *Biochemical Society Transactions*, 29, 250-67, 2001.
- [15] Hettema E.H., Distel B., Tabak H.F., Import of proteins into peroxisomes, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1451, 17-34, 1999.
- [16] Brown L.A., Baker A., Peroxisome biogenesis and the role of protein import, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 7, 388-400, 2003.
- [17] Fickers P., Benetti P.H., Waché Y., Marty A., Mauersberger S., Smit M.S., Nicaud J.M., Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications, *FEMS Yeast Research*, 5, 527-43, 2005.
- [18] Fickers P., Le Dall M.T., Gaillardin C., Thonart P., Nicaud J.M., New disruption cassettes for rapid gene disruption and marker rescue in the yeast *Yarrowia lipolytica*, *Journal of Microbiological Methods*, 55, 727-37, 2003.
- [19] Dujon B., *et al*, Genome evolution in yeasts, *Nature*, 430, 35-44, 2004.
- [20] Evers M.E., Höhfeld J., Kunau W.H., Harder W., Veenhuis M., Physiological studies on the utilization of oleic acid by *Saccharomyces cerevisiae* in relation to microbody development, *FEBS Microbiology Letters*, 69, 73-8, 1991.
- [21] Guo T., Kit Y.Y., Nicaud J.M., Le Dall M.T., Sears S.K., Vali H., Chan H. Rachubinski R.A., Titorenko V.I., Peroxisome division in the yeast *Yarrowia lipolytica* is regulated by a signal from inside the peroxisome, *The Journal of Cell Biology*, 162, 1255-66, 2003.

- [22] Smith J.J., Brown T.W., Eitzen G.A., Rachubinski R.A., Regulation of peroxisome size and number by fatty acid beta-oxidation in the yeast *Yarrowia lipolytica*, The Journal of Biological Chemistry, 275, 20168-78, 2000.
- [23] Gunkel K., van der Klei I.J., Barth G., Veenhuis M., Selective peroxisome degradation in *Yarrowia lipolytica* after a shift of cells from acetate/oleate/ethylamine into glucose/ammonium sulfate-containing media, FEBS Letters, 451, 1-4, 1999.
- [24] Eitzen G.A., Aitchison J.D., Szilard R.K., Veenhuis M., Nuttley W.M., Rachubinski R.A., The *Yarrowia lipolytica* gene PAY2 encodes a 42-kDa peroxisomal integral membrane protein essential for matrix protein import and peroxisome enlargement but not for peroxisome membrane proliferation, The Journal of Biological Chemistry, 270, 1429-36, 1995.
- [25] Cirigliano M.C., Carman G.M., Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*, Applied and Environmental Microbiology, 48, 747-50, 1984.
- [26] Zinjarde S.S., Pant A., Emulsifier from a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589, Journal of Basic Microbiology, 42, 67-73, 2002.
- [27] Kim T.H., Oh Y.S., Kim S.J., The Possible Involvement of the Cell Surface in Aliphatic Hydrocarbon Utilization by an Oil Degrading Yeast, *Yarrowia lipolytica* 180, Journal of Microbiology and Biotechnology (Korean Society for Microbiology and Biotechnology), 10, 333-37, 2000.
- [28] Guerzoni M.E., Lanciotti R., Vannini L., Galgano F., Favati F., Gardini F., Suzzi G., Variability of the lipolytic activity in *Yarrowia lipolytica* and its dependence on environmental conditions, International Journal of Food Microbiology, 69, 79-89, 2001.
- [29] Fickers P., Nicaud J.M., Destain J., Overproduction of lipase by *Yarrowia lipolytica* mutants, Applied Microbiology and Biotechnology, 63, 136-42, 2003.
- [30] Fickers P., Fudalej F., Le Dall M.T., Casaregola S., Gaillardin C., Thonart P., Nicaud J.M., Identification and characterisation of LIP7 and LIP8 genes encoding two extracellular triacylglycerol lipases in the yeast *Yarrowia lipolytica*, Fungal

Genetics and Biology, 42, 264-74, 2005.

- [31] Kohlwein S.D., Paltauf F., Uptake of fatty acids by the yeasts, *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomycopsis lipolytica*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 792, 310-17, 1984.
- [32] Dell'Angelica E.C., Ermácora M.R., Santomé J.A., Purification and partial characterization of a fatty acid-binding protein from the yeast *Yarrowia lipolytica*, *Biochemistry and Molecular Biology International*, 39, 439-45, 1996.
- [33] Ferreyra R.G., Burgardt N.I., Milikowski D., Melen G., Kornblihtt A.R., Dell'Angelica E.C., Santomé J.A., Ermácora M.R., A yeast sterol carrier protein with fatty acid and fatty-acyl-CoA binding activity, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 453, 197-206, 2006.
- [34] López M.C., Nicaud J.M., Skinner H.B., Vergnolle C., Kader J.C., Bankaitis V.A., Gaillardin C., A phosphatidylinositol/phosphatidylcholine transfer protein is required for differentiation of the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica* from the yeast to the mycelial form, *The Journal of Cell Biology*, 125, 113-27, 1994.
- [35] Dommes P., Dommes V., Kunau W.H., Beta-Oxidation in *Candida tropicalis*. Partial purification and biological function of an inducible 2,4-dienoyl coenzyme A reductase, *The Journal of Biological Chemistry*, 258, 10846-52, 1983.
- [36] Iida T., Sumita T., Ohta A., Takagi M., The cytochrome P450ALK multigene family of an n-alkane-assimilating yeast, *Yarrowia lipolytica*: cloning and characterization of genes coding for new CYP52 family members, *Yeast*, 16, 1077-87, 2000.
- [37] Hanley K., Nguyen L.V., Khan F., Pogue G.P., Vojdani F., Panda S., Pinot F., Oriedo V.B., Rasochova L., Subramanian M., Miller B., White E.L., Development of a plant viral-vector-based gene expression assay for the screening of yeast cytochrome p450 monooxygenases, *Assay and Drug Development Technology*, 1, 147-60, 2003.
- [38] Kamiryo T., Mishina M., Tashiro S.I., Numa S., *Candida lipolytica* mutants defective in an acyl-coenzyme A synthetase: isolation and fatty acid metabolism,

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74, 4947-50, 1977.

- [39] Mishina M., Kamiryo T., Tashiro S., Hagihara T., Tanaka A., Fukui S., Osumi M., Numa S., Subcellular localization of two long-chain acyl-coenzyme-A synthetases in *Candida lipolytica*, European Journal of Biochemistry / FEBS, 89, 321-28, 1978.
- [40] Yamagami S., Iida T., Nagata Y., Ohta A., Takagi M., Isolation and characterization of acetoacetyl-CoA thiolase gene essential for *n*-decane assimilation in yeast *Yarrowia lipolytica*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 282, 832-8, 2001.
- [41] Murphy D.J., The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms, Progress in Lipid Research, 40, 325-38, 2001.
- [42] Mlícková K., Roux E., Athenstaedt K., d'Andrea S., Daum G., Chardot T., Nicaud J.M., Lipid accumulation, lipid body formation, and acyl coenzyme A oxidases of the yeast *Yarrowia lipolytica*, Applied and Environmental Microbiology, 70, 3918-24, 2004.
- [43] Olofsson S.O., Boström P., Andersson L., Rutberg M., Perman J., Borén J., Lipid droplets as dynamic organelles connecting storage and efflux of lipids, Biochimica et Biophysica Acta, 1791, 448-58, 2009.
- [44] Michel C.I., Schaffer J.E., As a Matter of Fat, Cell Metabolism, 10, 9-12, 2009.
- [45] Mukherjee S., Maxfield F.R., Lipid and cholesterol trafficking in NPC, Biochimica et Biophysica Acta, 1685, 28-37, 2004.
- [46] Canevari L., Clark J.B., Alzheimer's Disease and Cholesterol: The Fat Connection, Neurochemical Research, 32, 739-50, 2007.
- [47] Gallegos A.M., Atshaves B.P., Storey S.M., Starodub O., Petrescu A.D., Huang H., McIntosh A.L., Martin G.G., Chao H., Kier A.B., Schroeder F., Gene structure, intracellular localization, and functional roles of sterol carrier protein-2, Progress in Lipid Research, 40, 498-563, 2001.

- [48] Adamski J., Normand T., Leenders F., Monté D., Begue A., Stéhelin D., Jungblut P.W., de Launoit Y., Molecular cloning of a novel widely expressed human 80 kDa 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase IV, *The Biochemical Journal*, 311, 437-43, 1995.
- [49] Seedorf U., Engel T., Assmann G., Leenders F., Adamski J., Intrinsic sterol- and phosphatidylcholine transfer activities of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type IV, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 55, 549-53, 1995.
- [50] Ohba T., Rennert H., Pfeifer S.M., He Z., Yamamoto R., Holt J.A., Billheimer J.T., Strauss J.F.III, The structure of the human sterol carrier protein X/sterol carrier protein 2 gene (SCP2), *Genomics*, 24, 370-4, 1994.
- [51] Ohba T., Holt J.A., Billheimer J.T., Strauss J.F.III, Human sterol carrier protein x/sterol carrier protein 2 gene has two promoters, *Biochemistry*, 34, 10660-8, 1995.
- [52] Dai J., Xie Y., Wu Q., Wang L., Yin G., Ye X., Zeng L., Xu J., Ji C., Gu S., Huang Q., Zhao R.C., Mao Y., Molecular cloning and characterization of a novel human hydroxysteroid dehydrogenase-like 2 (HSDL2) cDNA from fetal brain, *Biochemical Genetics*, 41, 165-74, 2003.
- [53] Stewart G.W., Hemolytic disease due to membrane ion channel disorders, *Current Opinion in Hematology*, 11, 244-50, 2004.
- [54] Seidel G., Prohaska R., Molecular cloning of hSLP-1, a novel human brain-specific member of the band 7/MEC-2 family similar to *Caenorhabditis elegans* UNC-24, *Gene*, 225, 23-9, 1998.
- [55] Deloukas P., *et al*, The DNA sequence and comparative analysis of human chromosome 20, *Nature*, 414, 865-71, 2001.
- [56] Seedorf U., Raabe M., Ellinghaus P., Kannenberg F., Fobker M., Engel T., Denis S., Wouters F., Wirtz K.W.A., Wanders R.J.A., Maeda N., Assmann G., Defective peroxisomal catabolism of branched fatty acyl coenzyme A in mice lacking the sterol carrier protein-2/sterol carrier protein-x gene function, *Genes and Development*, 12, 1189-201, 1998.

- [57] Seedorf U., Assmann G., Cloning, expression and nucleotide sequence of rat liver sterol carrier protein-2 cDNAs, *The Journal of Biological Chemistry*, 266, 630-6, 1991.
- [58] Pfeifer S.M., Sakuragi N., Ryan A., Johnson A.L., Deeley R.G., Billheimer J.T., Baker M.E., Strauss J.F.III, Chicken sterol carrier protein 2/sterol carrier protein x: cDNA cloning reveals evolutionary conservation of structure and regulated expression, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 304, 287-93, 1993.
- [59] Lan Q., Wessely V., Expression of a sterol carrier protein-x gene in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, *Insect Molecular Biology*, 13, 519-29, 2004.
- [60] Barnes T.M., Jin Y., Horvitz H.R., Ruvkun G., Hekimi S., The *Caenorhabditis elegans* behavioral gene unc-24 encodes a novel bipartite protein similar to both erythrocyte band 7.2 (stomatin) and nonspecific lipid transfer protein, *Journal of Neurochemistry*, 67, 46-57, 1996.
- [61] Bun-Ya M., Maebuchi M., Hashimoto T., Yokota S., Kamiryo T., A second isoform of 3-ketoacyl-CoA thiolase found in *Caenorhabditis elegans*, which is similar to sterol carrier protein-x but lacks the sequence of sterol carrier protein-2, *European Journal of Biochemistry/FEBS*, 245, 252-9, 1997.
- [62] Adams M.D., *et al*, The genome sequence of *Drosophila melanogaster*, *Science*, 287, 2185-95, 2000.
- [63] Krebs K.C., Lan Q., Isolation and expression of a sterol carrier protein-2 gene from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, *Insect Molecular Biology*, 12, 51-60, 2003.
- [64] Vyazunova I., Wessley V., Kim M., Lan Q., Identification of two sterol carrier protein-2 like genes in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, *Insect Molecular Biology*, 16, 305-14, 2007.
- [65] Dyer D.H., Vyazunova I., Lorch J.M., Forest K.T., Lan Q., Characterization of the yellow fever mosquito sterol carrier protein-2 like 3 gene and ligand-bound protein structure, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 326, 67-77, 2009.

- [66] Szabo L.J., Small G.M., Lazarow P.B., The nucleotide sequence of POX18, a gene encoding a small oleate-inducible peroxisomal protein from *Candida tropicalis*, *Gene*, 75, 119-26, 1989.
- [67] Tan H., Okazaki K., Kubota I., Kamiryo T., Utiyama H., A novel peroxisomal nonspecific lipid-transfer protein from *Candida tropicalis*. Gene structure, purification and possible role in beta-oxidation, *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 190, 107-12, 1990.
- [68] Tan H., Bun-Ya M., Hirata A., Kamiryo T., Predominant localization of non-specific lipid-transfer protein of the yeast *Candida tropicalis* in the matrix of peroxisomes, *Yeast*, 10, 1065-74, 1994.
- [69] Hwang C.W., Yano K., Takagi M., Sequences of two tandem genes regulated by carbon sources, one being essential for n-alkane assimilation in *Candida maltosa*, *Gene*, 106, 61-9, 1991.
- [70] Requena N., Füller P., Franken P., Molecular Characterization of GmFOX2, an Evolutionarily Highly Conserved Gene from the Mycorrhizal Fungus *Glomus mosseae*, Down-Regulated During Interaction with Rhizobacteria, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12, 934-42, 1999.
- [71] Lige B., Jayabalasingham B., Zhang H., Pypaert M., Coppens I., Role of an Ancestral D-Bifunctional Protein Containing Two Sterol-Carrier Protein-2 Domains in Lipid Uptake and Trafficking in *Toxoplasma*, *Molecular Biology of the Cell*, 20, 658-72, 2009.
- [72] Matsuoka S., Saito T., Kuwayama H., Morita N., Ochiai H., Maeda M., MFE1, a member of the peroxisomal hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase family, affects fatty acid metabolism necessary for morphogenesis in *Dictyostelium* spp, *Eukaryotic Cell*, 2, 638-45, 2003.
- [73] Meijer E.A., deVries S.C., Sterk P., Gadella D.W.Jr., Wirtz K.W., Hendricks T., Characterization of the nonspecific lipid transfer protein EP2 from carrot (*Daucus carota* L.), *Molecular and Cellular Biochemistry*, 123, 159-66, 1993.
- [74] Desormeaux A., Blochet J.E., Pezolet M., Marion D., Amino acid sequence of a

non-specific wheat phospholipid transfer protein and its conformation as revealed by infrared and Raman spectroscopy: role of disulfide bridges and phospholipids in the stabilization of the α -helix structure, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1121, 137-52, 1992.

[75] Gincel E., Simorre J.P., Caille A., Marion D., Ptak M., Vovelle F., Three-dimensional structure in solution of a wheat lipid-transfer protein from multidimensional ^1H -NMR data. A new folding for lipid carriers, *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 226, 413-22, 1994.

[76] Deckert G., *et al*, The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*, *Nature*, 392, 353-8, 1998.

[77] Stover C.K., *et al*, Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen, *Nature*, 406, 959-64, 2000.

[78] Bult C.J., *et al*, Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*, *Science*, 273, 1058-73, 1996.

[79] She Q., *et al*, The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 7835-40, 2001.

[80] Fitz-Gibbon S.T., Ladner H., Kim U.J., Stetter K.O., Simon M.I., Miller J.H., Genome sequence of the hyperthermophilic crenarchaeon *Pyrobaculum aerophilum*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 984-9, 2002.

[81] Kawarabayasi Y., *et al*, Complete genome sequence of an aerobic hyper-thermophilic crenarchaeon, *Aeropyrum pernix* K1, *DNA Research:an International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes*, 6, 83-101, 1999.

[82] Murzin A.G., Brenner S.E., Hubbard T., Chothia C., SCOP: A Structural Classification of Proteins Database for the Investigation of Sequences and Structures, *Journal of Molecular Biology*, 247, 536-40, 1995.

[83] López-García F., Szyperski T., Dyer, J.H., Choinowski, T., Seedorf, U., Hauser, H.,

- Wuthrich, K., NMR Structure of the Sterol Carrier Protein-2: Implications for the Biological Role, *Journal of Molecular Biology*, 295, 595-603, 2000.
- [84] Stanley W.A., Filipp F.V., Kursula P., Schüller N., Erdmann R., Schliebs W., Sattler M., Wilmanns M., Recognition of a functional peroxisome type 1 target by the dynamic import receptor pex5p, *Molecular Cell*, 24, 653-63, 2006.
- [85] Filipp F.V., Sattler M., Conformational Plasticity of the Lipid Transfer Protein SCP2, *Biochemistry*, 46, 7980-91, 2007.
- [86] Choinowski T., Hauser H., Piontek K., Structure of Sterol Carrier Protein 2 at 1.8 Å Resolution Reveals a Hydrophobic Tunnel Suitable for Lipid Binding, *Biochemistry*, 39, 1897-902, 2000.
- [87] Szyperski T., Scheek S., Johansson J., Assmann G., Seedorf U., Wuthrich K., NMR determination of the secondary structure and the three-dimensional polypeptide backbone fold of the human sterol carrier protein 2, *FEBS Letters*, 335, 18-26, 1993.
- [88] Weber F.E., Dyer J. H., López-García F., Werder M., Szyperski T., Wuthrich K., Hauser H., In pre-sterol carrier protein 2 (SCP2) in solution the leader peptide 1-20 is flexibly disordered, and residues 21-143 adopt the same globular fold as in mature SCP2, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 54, 751-9, 1998.
- [89] Haapalainen A.M., van Aalten D.M., Merilainen G., Jalonen J.E., Pirila P., Wierenga R.K., Hiltunen J.K., Glumoff T., Crystal Structure of the Liganded SCP-2-like Domain of Human Peroxisomal Multifunctional Enzyme Type 2 at 1.75 Å Resolution, *The Journal of Molecular Biology*, 313, 1127-38, 2001.
- [90] Dyer D.H., Lovell S., Thoden J.B., Holden H.M., Rayment I., Lan Q., The Structural Determination of an Insect Sterol Carrier Protein-2 with a Ligand-bound C16 Fatty Acid at 1.35-Å Resolution, *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 39085-91, 2003.
- [91] Goroncy A., Kigawa T., Koshiba S., Tomizawa T., Kobayashi N., Tochio, N., Inoue, M., Yokoyama S., Solution structure of the conserved hypothetical protein TT1886, possibly sterol carrier protein, from *Thermus Thermophilus* HB8, 2004.

- [92] Murayama K., Shirouzu M., Yokoyama S., Crystal structure of sterol carrier protein 2, 2005.
- [93] Joint Center for Structural Genomics (JCSG), Crystal structure of putative sterol carrier protein 2 (2649030) from *Archaeoglobus fulgidus* at 2.11 Å resolution, 2007.
- [94] Dyer D.H., Wessely V., Forest K.T., Lan Q., Three-dimensional structure/function analysis of SCP-2-like 2 reveals differences among SCP-2 family members, *Journal of Lipid Research*, 49, 644-53, 2008.
- [95] Stolowich N.J., Petrescu A.D., Huang H., Martin G.G., Scott A.I., Schroeder F., Sterol carrier protein-2: structure reveals function, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59, 193-212, 2002.
- [96] Frolov A., Cho T.H., Billheimer J.T., Schroeder F., Sterol Carrier Protein-2, a New Fatty Acyl Coenzyme A-binding Protein, *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 31878-84, 1996.
- [97] Stolowich N.J., Frolov A., Atshaves B., Murphy E.J., Jolly C.A., Billheimer J.T., Scott A.I., Schroeder F., The Sterol Carrier Protein-2 Fatty Acid Binding Site: An NMR, Circular Dichroic, and Fluorescence Spectroscopic Determination, *Biochemistry*, 36, 1719-29, 1997.
- [98] Schroeder F., Dempsey M.E., Fischer R.T., Sterol and Squalene Carrier Protein Interactions with Fluorescent delta (7,9(11))-Cholestatrien-3-beta-ol, *The Journal of Biological Chemistry*, 260, 2904-11, 1985.
- [99] Schroeder F., Butko P., Nemecz G., Scallen T.J., Interaction of fluorescent delta (7,9(11))-Cholestatrien-3-beta-ol with Sterol Carrier Protein-2, *The Journal of Biological Chemistry*, 265, 151-7, 1990.
- [100] Colles S.M., Woodford J.K., Moncecchi D., Myers-Payne S.C., McLean L.R., Billheimer J.T., Schroeder F., Cholesterol interaction with recombinant human Sterol Carrier Protein-2, *Lipids*, 30, 795-803, 1995.
- [101] Martin G.G., Hostetler H.A., McIntosh A.L., Tichy S.E., Williams B.J., Russell

- D.H., Berg J.M., Spencer T.A., Ball J., Kier A.B., Schroeder F., Structure and Function of the Sterol Carrier Protein-2 N-Terminal Presequence, *Biochemistry*, 47, 5915-34, 2008.
- [102] Westerman J., Wirtz K.W., The primary structure of the nonspecific lipid transfer protein (sterol carrier protein 2) from bovine liver, *Biochemical and Biophysics Research Communication*, 127, 333-8, 1985.
- [103] Gadella T.W.Jr., Bastiaens P.I.H., Visser A.J.W.G., Wirtz K.W.A., Shape and Lipid-Binding Site of the Nonspecific Lipid-Transfer Protein (Sterol Carrier Protein 2): A Steady-State and Time-Resolved Fluorescence Study, *Biochemistry*, 30, 5555-64, 1991.
- [104] Cantor C., Schimmel P., *Biophysical Chemistry*, 1980.
- [105] Hockney R.C., Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli*, *Trends in biotechnology*, 12, 456-63, 1994.
- [106] Nozaki Y., Determination of tryptophan, tyrosine, and phenylalanine by second derivative spectrophotometry, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 277, 324-33,
- [107] Dunach M., Sabes M., Padros E., Fourth-Derivative Spectrophotometry Analysis of Tryptophan Environment in Proteins. Application to Melittin, Cytochrome C and Bacteriorhodopsin, *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 134, 123-8, 1983.
- [108] Deléage G., Geourjon C., An interactive graphic program for calculating the secondary structure content of proteins from circular dichroism spectrum, *Computer Applications in the Biosciences: CABIOS*, 9, 197-9, 1993.
- [109] Kelly S.M., Jess T.J, Price N.C., How to study proteins by circular dichroism, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1751, 119-39, 2005.
- [110] Uversky V.N., Use of fast protein size-exclusion liquid chromatography to study the unfolding of proteins which denature through the molten globule, *Biochemistry*, 32, 13288-98, 1993.

- [111] Wen J., Arakawa T., Philo J.S., Size-Exclusion Chromatography with On-Line Light-Scattering, Absorbance, and Refractive Index Detectors for Studying Proteins and Their Interactions, *Analytical Biochemistry*, 240, 155-66, 1996.
- [112] Glatter O., Kratky O., *Small-angle X-ray Scattering*, 1982.
- [113] Gast K., Damaschun H., Eckert K., Schulze-Forster K., Maurer H.R., Mueller-Frohne M., Zirwer D., Czarnecki J., Damaschun G., Prothymosin alpha: a biologically active protein with random coil conformation, *Biochemistry*, 34, 13211-8, 1995.
- [114] Williamson T.E., Craig B.A., Kondrashkina E., Bailey-Kellogg C., Friedman A.M., Analysis of Self-Associating Proteins by Singular Value Decomposition of Solution Scattering Data, *Biophysical Journal*, 94, 4906-23, 2008.
- [115] Weber G., Fluorescence-Polarization Spectrum and Electronic-Energy Transfer in Proteins, *The Biochemical Journal*, 75, 345-52, 1960.
- [116] Lakowicz J., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 1999.
- [117] González Flecha F.L., Levi V., Determination of the Molecular Size of BSA by Fluorescence Anisotropy, *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 31, 319-22, 2003.
- [118] Kiemer L., Bendtsen J.D., Blom N., NetAcet: prediction of N-terminal acetylation sites, *Bioinformatics*, 21, 1269-70, 2005.
- [119] Neuberger G., Maurer-Stroh S., Eisenhaber B., Hartig A., Eisenhaber F., Motif refinement of the peroxisomal targeting signal 1 and evaluation of taxon-specific differences, *Journal of Molecular Biology*, 328, 567-79, 2003.
- [120] Bates P.A., Kelley L.A., McCallum R.M., Sternberg M.J.E., Enhancement of protein modeling by human intervention in applying the automatic programs 3D-JIGSAW and 3D-PSSM, *Proteins*, 45, 39-46, 2001.
- [121] Yamamoto R., Kallen C.B., Babalola G.O., Rennert H., Billheimer J.T., Strauss J.F.III, Cloning and expression of cDNA encoding human SCP-2, *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences of the United States of America, 88, 463-7, 1991.
- [122] Moncecchi D., Pastuszyn A., Scallen T.J., cDNA Sequence and Bacterial Expression of Mouse Liver Sterol Carrier Protein-2, The Journal of Biological Chemistry, 266, 9885-92, 1991.
- [123] Matsuura J.E., George H.J., Ramachandran N., Alvarez J.G., Strauss J.F.III, Billheimer J.T., Expression of the Mature and the Pro-Form of Human Sterol Carrier Protein 2 in *Escherichia coli* Alters Bacterial Lipids, Biochemistry, 32, 567-72, 1993.
- [124] Huang H., Gallegos A.M., Zhou M., Ball J.M., Schroeder F., Role of the Sterol Carrier Protein-2 N-Terminal Membrane Binding Domain in Sterol Transfer, Biochemistry, 41, 12149-12162, 2002.
- [125] Falomir-Lockhart L.J., Burgardt N.I., Ferreyra R.G., Ceolín M.R., Ermácora M.R., Córscico B., Collision-mediated transfer of fatty acids from *Yarrowia lipolytica* sterol carrier protein 2 to phospholipid membranes, Biophysical Journal, 97, 248-56, 2009.
- [126] Huang H., Ball J.M., Billheimer J.T., Schroeder F., The sterol carrier protein-2 amino terminus: a membrane interaction domain, Biochemistry, 38, 13231-43, 1999.
- [127] Dill K.A., Dominant Forces in Protein Folding, Biochemistry, 31, 7133-55, 1990.
- [128] Petsko G.A., Ringe D., Protein structure and function, 2004.
- [129] Nelson D.L., Cox M.M., Lehninger Principles of Biochemistry, 2005.
- [130] Noland B.J., Arebalo R.E., Hansbury E., Scallen T.J., Purification and Properties of Sterol Carrier Protein 2, The Journal of Biological Chemistry, 255, 4282-9, 1980.
- [131] Jatzke C., Hinz H.J., Seedorf U., Assmann G., Stability and binding properties of wild-type and c17s mutated human sterol carrier protein 2, Biochimica et Biophysica Acta, 1432, 265-274, 1999.
- [132] Schroeder F., Frolov A., Starodub O., Atshaves B.B., Russell W., Petrescu A., Huang H., Gallegos A.M., McIntosh A., Tahotna D., Russell D.H., Billheimer J.T., Baum C.L., Kier A.B., Pro-sterol Carrier Protein-2. Role of the N-

terminal presequence in structure, function, and peroxisomal targeting , The Journal of Biological Chemistry, 275, 25547-55, 2000.

- [133] Hapala I., Kavecansky J., Butko P., Scallen J., Joiner C., Schroeder F., Regulation of membrane cholesterol domains by sterol carrier protein-2, Biochemistry, 33, 7682-90, 1994.
- [134] Schroeder F., Myers-Payne S.C., Billheimer J.T., Wood W.G., Probing the Ligand Binding Sites of Fatty Acid and Sterol Carrier Proteins: Effects of Ethanol, Biochemistry, 34, 11919-27, 1995.
- [135] Avdulov N.A., Chochina S.V., U.I., Warden C.S., Schroeder F., Wood W.G., Lipid binding to sterol carrier protein-2 is inhibited by ethanol, Biochimica et Biophysica Acta, 1437, 37-45, 1999.
- [136] Baxter N.J., Hosszu L.L., Waltho J.P., Williamson M.P., Characterisation of low free-energy excited states of folded proteins, Journal of Molecular Biology, 284, 1625-39, 1998.
- [137] van der Lende T.R., Breeuwer P., Abee T., Konings W.N., Driessen A.J., Assessment of the microbody luminal pH in the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*, Biochimica et Biophysica Acta, 1589, 104-11, 2002.
- [138] Dansen T.B., Wirtz K.W., Wanders R.J.A., Pap E.H., Peroxisomes in human fibroblasts have a basic pH, Nature Cell Biology, 2, 51-3, 2000.
- [139] van Roermund C.W.T., de Jong M., IJlst L., van Marle J., Dansen T.B., Wanders R.J.A., Waterham H.R., The peroxisomal lumen in *Saccharomyces cerevisiae* is alkaline, Journal of Cell Science, 117, 4231-7, 2004.
- [140] Nicolay K., Veenhuis M., Douma A.C., Harder W., A ³¹P NMR study of the internal pH of yeast peroxisomes, Archives of Microbiology, 147, 37-41, 1987.
- [141] Waterham H.R., Keizer-Gunnink I., Goodman J.M., Harder W., Veenhuis M., Immunocytochemical evidence for the acidic nature of peroxisomes in methylotrophic yeasts, FEBS Letters, 262, 17-9, 1990.

- [142] Jóhannesson H., Denisov V.P., Halle B., Dimethyl sulfoxide binding to globular proteins: A nuclear magnetic relaxation dispersion study, *Protein Science*, 6, 1756-63, 1997.
- [143] Yang Z.W., Tendian S.W., Carson W.M., Brouillette W.J., Delucas L.J., Brouillette C.G., Dimethyl sulfoxide at 2.5% (v/v) alters the structural cooperativity and unfolding mechanism of dimeric bacterial NAD⁺ synthetase, *Protein Science*, 13, 830-41, 2004.
- [144] Damaschun G., Damaschun H., Gast K., Gernat C., Zirver C., Acid denatured apo-cytochrome C is a random coil: evidence from small-angle X-ray scattering and dynamic light scattering, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1078, 289-95, 1991.
- [145] Kuznetsova I.M., Turoverov K.K., Uversky V.N., Use of the Phase Diagram Method to Analyze the Protein Unfolding-Refolding Reactions: Fishing Out the "Invisible" Intermediates, *Journal of Proteome Research*, 3, 485-94, 2004.
- [146] Aguedo M., Waché Y., Belin J.M., Intracellular pH-dependent efflux of the fluorescent probe pyranine in the yeast *Yarrowia lipolytica*, *FEMS Microbiology Letters*, 200, 185-9, 2001.
- [147] Szabo R., Dimorphism in *Yarrowia lipolytica*: filament formation is suppressed by nitrogen starvation and inhibition of respiration, *Folia Microbiology*, 44, 19-24, 1999.
- [148] Szabo R., Štofániková V., Presence of organic sources of nitrogen is critical for filament formation and pH-dependent morphogenesis in *Yarrowia lipolytica*, *FEMS Microbiology Letters*, 206, 45-50, 2002.
- [149] Schroeder F., Atshaves B.P., McIntosh A.L., Gallegos A.M., Storey S.M., Parr R.D., Jefferson J.R., Ball J.M., Kier A.B., Sterol carrier protein-2: New roles in regulating lipid rafts and signaling, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1771, 700-18, 2007.
- [150] Kernstock R.M., Girotti A.W., Lipid transfer protein binding of unmodified natural lipids as assessed by surface plasmon resonance methodology, *Analytical Biochemistry*, 365, 111-21, 2007.

- [151] Fischer R.T., Cowlen M.S., Dempsey M.E., Schroeder F., Fluorescence of delta 5,7,9(11),22-ergostatetraen-3-beta-ol in micelles, sterol carrier protein complexes, and plasma membranes, *Biochemistry*, 24, 3322-31, 1985.
- [152] Stolowich N., Frolov A., Petrescu A.D., Scott A.I., Billheimer J.T., Schroeder F., Holo-sterol Carrier Protein-2. ¹³C NMR Investigation of cholesterol and fatty acid binding sites, *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 35425-33, 1999.
- [153] Sams G.H., Hargis B.M., Hargis P.S., Identification of two lipid binding proteins from liver of *Gallus domesticus*, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 99, 213-9, 1991.
- [154] Scallen T.J., Noland B.J., Gavey K.L., Bass N.M., Ockner R.K., Chanderbhan R., Vahouny G.V., Sterol Carrier Protein 2 and Fatty Acid-binding Protein. Separate and distinct physiological functions, *The Journal of Biological Chemistry*, 260, 4733-9, 1985.
- [155] Dansen T.B., Westerman J., Wouters F.S., Wanders R.J., van Hoek A., Gadella T.W.Jr., Wirtz K.W., High-affinity binding of very-long-chain fatty acyl-CoA esters to the peroxisomal non-specific lipid-transfer protein (sterol carrier protein-2), *The Biochemical Journal*, 339, 193-9, 1999.
- [156] Frolov A., Miller K., Billheimer J.T., Cho T.H., Schroeder F., Lipid specificity and location of the sterol carrier protein-2 fatty acid-binding site: a fluorescence displacement and energy transfer study, *Lipids*, 32, 1201-9, 1997.
- [157] Black S.L., Stanley W.A., Filipp F.V., Bhairo M., Verma A., Wichmann O., Sattler M., Wilmanns M., Schultz C., Probing lipid- and drug-binding domains with fluorescent dyes, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16, 1162-73, 2008.
- [158] Bloj B., Zilversmit D.B., Rat Liver Proteins Capable of Transferring Phosphatidylethanolamine. Purification and transfer activity for other phospholipids and cholesterol, *The Journal of Biological Chemistry*, 252, 1613-9, 1977.
- [159] Crain R.C., Zilversmit D.B., Two nonspecific phospholipid exchange proteins from beef liver. I Purification and characterization, *Biochemistry*, 19, 1433-9, 1980.

- [160] Wirtz K.W., Gadella T.W.Jr., Properties and modes of action of specific and non-specific phospholipid transfer proteins, *Experientia*, 46, 592-9, 1990.
- [161] Nichols J.W., Binding of fluorescent-labeled phosphatidylcholine to rat liver nonspecific lipid transfer protein, *The Journal of Biological Chemistry*, 262, 14172-7, 1987.
- [162] Gadella T.W.Jr, Wirtz K.W., The low-affinity lipid binding site of the non-specific lipid transfer protein. Implications for its mode of action, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1070, 237-45, 1991.
- [163] Gadella T.W.Jr, Wirtz K.W., Phospholipid binding and transfer by the nonspecific lipid-transfer protein (sterol carrier protein 2.) A kinetic model, *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 220, 1019-28, 1994.
- [164] Atshaves B.P., Jefferson J.R., McIntosh A.L., Gallegos A, McCann B.M., Landrock K.K., Kier A.B., Schroeder F., Effect of Sterol Carrier Protein-2 expression on sphingolipid distribution in plasma membrane lipid rafts/caveolae, *Lipids*, 42, 871-84, 2007.
- [165] Edqvist J., Rönnerberg E., Rosenquist S., Blomqvist K., Viitanen L., Salminen T.A., Nylund M., Tuuf J., Mattjus P., Plants Express a Lipid Transfer Protein with High Similarity to Mammalian Sterol Carrier Protein-2, *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 53544-53, 2004.
- [166] Vila A., Levchenko V.V., Korytowski W., Girotti A.W., Sterol Carrier Protein-2 Facilitated Intermembrane Transfer of Cholesterol- and Phospholipid-Derived Hydroperoxides, *Biochemistry*, 43, 12592-605, 2004.
- [167] Woodford J.K., Colles S.M., Myers-Payne S., Billheimer J.T., Schroeder F., Sterol carrier protein-2 stimulates intermembrane sterol transfer by direct membrane interaction, *Chemistry and Physics of Lipids*, 76, 73-84, 1995.
- [168] van Amerongen A., Demel R.A., Westerman J., Wirtz K.W., Transfer of cholesterol and oxysterol derivatives by the nonspecific lipid transfer protein (sterol carrier protein 2): a study on its mode of action, *Biochimica et Biophysica Acta*,

1004, 36-43, 1989.

- [169] Billheimer J.T., Gaylor J.L., Effect of lipid composition on the transfer of sterols mediated by non-specific lipid transfer protein (sterol carrier protein 2), *Biochimica et Biophysica Acta*, 1046, 136-43, 1990.
- [170] Leonard A.N., Cohen D.E., Submicellar bile salts stimulate phosphatidylcholine transfer activity of sterol carrier protein 2, *Journal of Lipid Research*, 39, 1981-8, 1998.
- [171] Schroeder F., Zhou M., Swaggerty C.L., Atshaves B.P., Petrescu A.D., Storey S.M., Martin G.G., Huang H., Helmkamp G.M., Ball J.M., Sterol Carrier Protein-2 Functions in Phosphatidylinositol Transfer and Signaling, *Biochemistry*, 42, 3189-202, 2003.
- [172] Huang H., Ball J.M., Billheimer J.T., Schroeder F., Interaction of the N-terminus of sterol carrier protein 2 with membranes: role of membrane curvature, *The Biochemical Journal*, 344, 593-603, 1999.
- [173] Stanley W.A., Versluis K., Schultz C., Heck A.J., Wilmanns M., Investigation of the ligand spectrum of human sterol carrier protein 2 using a direct mass spectrometry assay, *Archives of biochemistry and biophysics*, 461, 50-8, 2007.
- [174] Seedorf U., Scheekhl S., Engel T., SteiF C., Him H.J., Assmann G., Structure-Activity Studies of Human Sterol Carrier Protein 2, *The Journal of Biological Chemistry*, 269, 2613-8, 1994.
- [175] Pastuszynz A., Noland B.J., Bazan J.F., Fletterick R.J., Scallen T.J., Primary sequence and structural analysis of sterol carrier protein 2 from rat liver: homology with immunoglobulins, *The Journal of Biological Chemistry*, 262, 13219-27, 1987.
- [176] Sklar L.A., Hudson B.S., Simoni R.D., Conjugated polyene fatty acids as fluorescent probes: binding to bovine serum albumin, *Biochemistry*, 16, 5100-08, 1977.
- [177] Vorum H., Brodersen R., Kragh-Hansen U., Pedersen A.O., Solubility of long-chain fatty acids in phosphate buffer at pH 7.4, *Biochimica et Biophysica Acta*,

1126, 135-42, 1992.

- [178] Constantinides P.P., Steim J.M., Physical Properties of Fatty Acyl-CoA. Critical micelle concentrations and micellar size and shape, *The Journal of Biological Chemistry*, 260, 7573-80, 1985.
- [179] Powell G.L., Grothusen J.R., Zimmerman J.K., Evans A., Fish W.W., A Re-examination of Some Properties of Fatty Acyl-CoA Micelles, *The Journal of Biological Chemistry*, 256, 12740-7, 1981.
- [180] Daniel E., Weber G., Cooperative effects in binding by bovine serum albumin. I-The binding of 1-aniline-8-naphthalenesulfonate. Fluorimetric titrations, *Biochemistry*, 5, 1893-1900, 1966.
- [181] Matulis D., Lovrien R., 1-Anilino-8-Naphthalene Sulfonate Anion-Protein Binding Depends Primarily on Ion Pair Formation, *Biophysical Journal*, 74, 422-9, 1998.
- [182] Celej M.S., Dassie S.A., Freire E., Bianconi M.L., Fidelio G.D., Ligand-induced thermostability in proteins: Thermodynamic analysis of ANS-albumin interaction, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1750, 122-33, 2005.
- [183] Hanhoff T., Lücke C., Spener F., Insights into binding of fatty acids by fatty acid binding proteins, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 239, 45-54, 2002.
- [184] Mulgrew-Nesbitt A., Diraviyam K., Wang J., Singh S., Murray P., Li Z., Rogers L., Mirkovic N., Murray D., The role of electrostatics in protein-membrane interactions, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1761, 812-26, 2006.
- [185] Berde C.B., Hudson B.S., Simoni R.D., Sklar L.A., Human Serum Albumin. Spectroscopic studies of binding and proximity relationships for fatty acids and bilirubin, *The Journal of Biological Chemistry*, 254, 391-400, 1979.
- [186] Zsila F., Imre T., Szabó P.T., Bikádi Z., Simonyi M., Induced chirality upon binding of cis-parinaric acid to bovine L-lactoglobulin: spectroscopic characterization of the complex, *FEBS Letters*, 520, 81-7, 2002.

- [187] Fukada H., Sturtevant J.M., Quijcho F.A., Thermodynamics of the binding of L-arabinose and of D-galactose to the L-arabinose-binding protein of *Escherichia coli*, The Journal of Biological Chemistry, 258, 13193-8, 1983.
- [188] Sturtevant J.M., Biochemical application of differential scanning calorimetry, Annual Review of Physical Chemistry, 38, 463-88, 1987.
- [189] Shrake A., Ross P.D., Ligand-induced biphasic protein denaturation, The Journal of Biological Chemistry, 265, 5055-9, 1990.
- [190] Shrake A., Ross P.D., Origin and consequences of ligand-induced multiphasic thermal protein denaturation, Biopolymers, 32, 925-40, 1992.
- [191] Manly S.P., Mathews K.S., Sturtevant J.S., Thermal denaturation of the core protein of the lac repressor, Biochemistry, 24, 3842-6, 1985.
- [192] Sanchez-Ruiz J.M., Ligand effects on protein thermodynamic stability, Biophysical Chemistry, 126, 43-9, 2007.
- [193] Sönnichsen F.D., Van Eyk J.E., Hodges R.S., Sykes B.D., Effect of trifluoroethanol on protein secondary structure: an NMR and CD study using a synthetic actin peptide, Biochemistry, 31, 8790-8, 1992.
- [194] Reiersen H., Rees A.R., Trifluoroethanol may form a solvent matrix for assisted hydrophobic interactions between peptide side chains, Protein Engineering, 13, 739-43, 2000.
- [195] Miller D.W., Dill K.A., Ligand binding to proteins: The binding landscape model, Protein Science, 6, 2166-79, 1997.
- [196] Foote J., Milstein C., Conformational isomerism and the diversity of antibodies, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 91, 10370-4, 1994.
- [197] Tsai C.J., Kumar S., Ma B., Nussinov R., Folding funnels, binding funnels, and protein function, Protein Science, 8, 1181-90, 1999.
- [198] Vallejo D.F., Zamarreño F., Guérin D.M., Grigera J.R., Costabel M.D., Prediction

- of the most favorable configuration in the ACBP-membrane interaction based on electrostatic calculation, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788, 696-700, 2009.
- [199] Herr F.M., Matarese V., Bernlohr D.A., Starch J., Surface Lysine Residues Modulate the Collisional Transfer of Fatty Acid from Adipocyte Fatty Acid Binding Protein to Membranes, *Biochemistry*, 34, 11840-5, 1995.
- [200] Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., *Molecular Cloning*, 1989.
- [201] Hoffman C.S., Winston F., A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*, *Gene*, 57, 267-72, 1987.
- [202] Higuchi R., *Principles and Applications for DNA Amplification*, 1989.
- [203] Birnboim H.C., Doly J., A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acids Research*, 7, 1513-23, 1979.
- [204] Schagger H., von Jagow G., Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa, *Analytical Biochemistry*, 166, 368-79, 1987.
- [205] Press W.H., Teukolsky S.A., Vetterling W.T., Flannery B.P., *The art of scientific computing*, 1992.
- [206] Clerico E.M., Peisajovich S.G., Ceolín M.R., Ghiringhelli P.D., Ermácora M.R., Engineering a compact non-native state of intestinal fatty acid-binding protein, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1476, 203-18, 2000.
- [207] Fasman G.D., *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*, 1996.
- [208] Lide D.L., *Handbook of Chemistry and Physics* CRC, 1999-2000.
- [209] Uversky V.N., Ptitsyn O.B., "Partly folded" state, a new equilibrium state of protein molecules: four-state guanidinium chloride-induced unfolding of beta-lactamase at low temperature, *Biochemistry*, 33, 2782-91, 1994.

- [210] Svergun D.I., Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria, *Journal of Applied Crystallography*, 25, 495-503, 1992.
- [211] Laskowski R.A., McArthur M.W., Moss D.S., Thornton J.M., PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures, *Journal of Applied Crystallography*, 26, 283-91, 1993.
- [212] Lee B., Richards F.M., The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility, *Journal of Molecular Biology*, 55, 379-400, 1971.
- [213] Fersht A., *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*, 1999.
- [214] Burstein E.A., *Intrinsic Protein Fluorescence: Origin and Applications*, 1976.
- [215] Miller D.M., Olson J.S., Pflugrath J.W., Quioco F.A., Rates of ligand binding to periplasmic proteins involved in bacterial transport and chemotaxis, *The Journal of Biological Chemistry*, 258, 13665-72, 1983.
- [216] Weber G., Young L.B., Fragmentation of Bovine Serum Albumin by Pepsin. I- The origin of the acid expansion of the albumin molecule, *The Journal of Biological Chemistry*, 239, 1415-23, 1964.
- [217] Wang Z.X., An exact mathematical expression for describing competitive binding of two different ligands to a protein molecule, *FEBS Letters*, 360, 111-4, 1995.
- [218] Huang H., Starodub O., McIntosh A., Atshaves B.P., Woldegiorgis G., Kier A.B., Schroeder F., Liver Fatty Acid-Binding Protein Colocalizes with Peroxisome Proliferator Activated Receptor α and Enhances Ligand Distribution to Nuclei of Living Cells, *Biochemistry*, 43, 2484-500, 2004.
- [219] Faergeman N.J., Sigurskjold B.W., Kragelund B.B., Andersen K.V., Knudsen J., Thermodynamics of ligand binding to acyl-coenzyme A binding protein studied by titration calorimetry, *Biochemistry*, 35, 14118-26, 1996.
- [220] Malencik D.A., Anderson S.R., *Peptide Binding by Calmodulin and Its Proteolytic*

Fragments and by Troponin C, *Biochemistry*, 23, 2420-8, 1984.

- [221] Leavitt S., Freire E., Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry, *Current Opinion in Structural Biology*, 11, 560-6, 2001.