



RIDAA
Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes



**Universidad
Nacional
de Quilmes**

Pérez De Berti, Federico Javier

Estudio de la estructura tridimensional de la SCP2 de *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:

Pérez De Berti, F. J (2018). *Estudio de la estructura tridimensional de la SCP2 de 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*
<http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/804>

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

Estudio de la estructura tridimensional de la SCP2 de *Yarrowia lipolytica*

TESIS DOCTORAL

Federico Javier Pérez De Berti

fberti@becarios.unq.edu.ar

Resumen

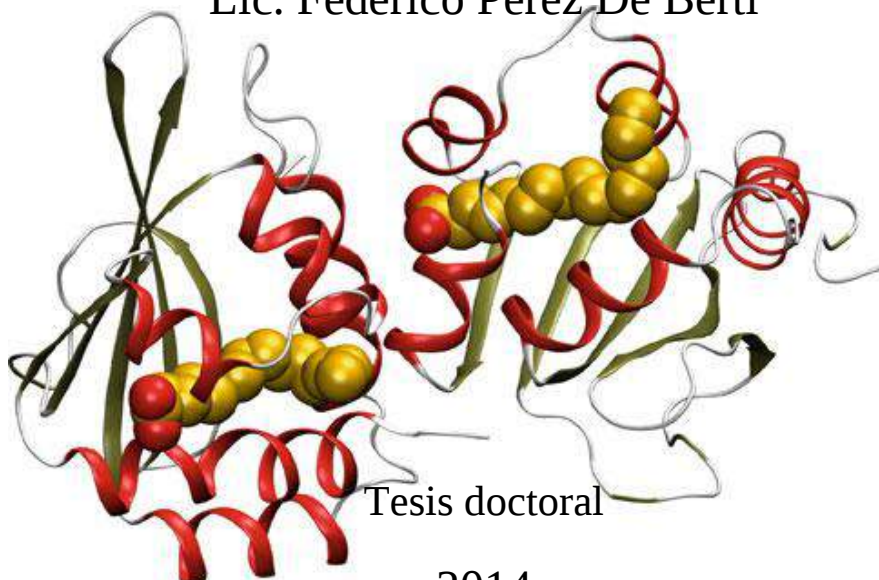
En esta tesis se desarrolló un robusto y eficiente protocolo de preparación y purificación de YLSCP2 que permite tanto su cristalización, como su obtención y estudio en su forma libre de ligando. La estructura de rayos X reportada expande significativamente el conjunto de dominios SCP2 de eucariotas y unifica el conocimiento sobre este dominio a lo largo de todos los reinos de la vida. De esta forma existe la posibilidad de realizar un completo examen comparativo de este ubicuo plegado proteico y sus propiedades.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE QUILMES

Departamento de Ciencia y Tecnología

Estudio de la estructura tridimensional de la SCP2 de *Yarrowia lipolytica*

Lic. Federico Pérez De Berti



2014

Director: Dr. Mario R. Ermácora

El presente trabajo de tesis fue realizado en su mayor parte en el Laboratorio de Expresión y Plegado de Proteínas (LEPP) de la Universidad Nacional de Quilmes (UNQ); y financiado por la UNQ, la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CoNICeT).

Otra parte de los experimentos se realizaron, en el marco de una pasantía de perfeccionamiento, en el Laboratorio de Biocristalografía a cargo del Dr. Hugo Mónaco, Departamento de Ciencia y Tecnología, Facultad de Ciencias de la Universidad de Estudio de Verona, Italia.

Publicaciones

Como parte de la formación, durante el desarrollo de esta tesis se publicaron los siguientes trabajos:

Beassoni, Paola R., Pérez De Berti, Federico, Otero, Lisandro H., Risso, Valeria A., Ferreyra, Raúl G., Lisa, A. Teresita, Domenech, Carlos E., y Ermácora, Mario R. Preparation and Biophysical Characterization of Recombinant *Pseudomonas aeruginosa* Phosphorylcholine Phosphatase. *Protein Expression and Purification* (2009) 71, 153-159.

Federico Pérez De Berti, Stefano Capaldi, Raúl Ferreyra, Noelia Burgardt, Juan P. Acierno, Sebastián Klinke, Hugo L. Mónaco, Mario R. Ermácora. The Crystal Structure of Sterol Carrier Protein 2 from *Yarrowia lipolytica* and the Evolutionary Conservation of a large, Non-Specific Lipid-Binding Cavity. *Journal of Structural and Functional Genomics* (2013) 14, 145–153.

La estructura cristalográfica de YLSCP2 resuelta en esta tesis se depositó en la base de datos PDB bajo el código 4JGX.

Agradecimientos

Agradezco en primera instancia a mi director el Dr. Mario Ermácora por trasmitirme su conocimiento, por su dedicación y paciencia y por permitirme realizar este trabajo de tesis en su laboratorio.

Les agradezco a mis padres su apoyo y ¡que todavía no me hayan rajado de casa!

A Raúl y Mauricio que han contestado de la mejor manera a cada duda que les he planteado y a cada pedido respondido afirmativamente.

A mis compinches de triangulación ‘perro loco’ Ale y ‘rulo loco’ Gabi.

Al Martín que por su sabiduría ha hecho tanto de compañero como de consultor.

Al Dr. Javi Santos que me ha dado una mano con diversos experimentos y unas cuantas risas con diversos chistes.

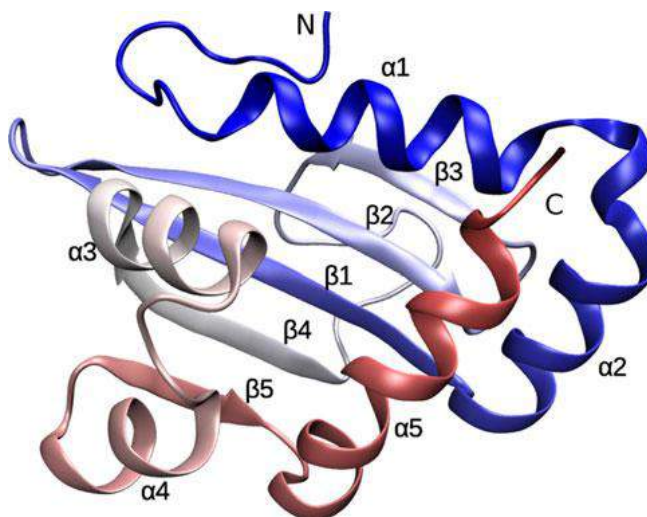
Al Dr. Juan Pablo Acierno cuyo ingreso al LEPP me permitió dar un salto en todo lo concerniente a cristalografía.

A los Drs. Hugo Mónaco y Maximiliano Perduca por recibirme y enseñarme todo cuanto pudieron en mi estadía en Italia.

Al Dr. Stefano Capaldi que me ayudó en todo en la Italia y ¡al Gran Manu! por recibirme en su casa y acompañarme ¡incluso hasta Argentina!

Al Seba Klinke ¡que cayó en el momento justito!

Y un agradecimiento especial a la Dra. Noelia Burgardt que siempre me ayudó en todo, desde el primer al último día.



Abreviaturas

ACBP	proteínas de unión a acil-CoA
acil-CoA	ácidos carboxílicos esterificados con coenzima A
ADN	ácido desoxirribonucleico
AP	ácido <i>cis</i> -parinámico
CD	dicroísmo circular
CI	cuerpos de inclusión (fracción insoluble)
CMC	concentración micelar crítica
DO ₆₀₀	densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm
DPG	1,2-dipalmitoil-sn-glicerol
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
ϵ	coeficiente de extinción molar
FA	ácidos grasos
FABP	proteínas de unión a ácidos grasos
FPLC	cromatografía rápida líquida de proteínas y péptidos
ID	código de identificación en una base de datos
K _D	constante de disociación
LB	medio de cultivo Luria-Bertani
nsLTP	proteínas transportadoras no específicas de lípidos
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDB	banco de datos de proteínas
pI	punto isoelectrico
PL	fosfolípidos

PM	peso molecular
PST1	señal de direccionamiento a peroxisomas tipo 1
<i>RMSD</i>	desplazamiento cuadrático medio
rpm	revoluciones por minuto
R_s	radio de Stokes
SAXS	dispersión de rayos <i>X</i> a bajo ángulo
SEC	cromatografía de exclusión molecular
SCP2	proteína transportadora de esteroides tipo-2
SDS	dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
SLBP	proteínas solubles que unen lípidos
TG	triglicéridos
UA	unidades arbitrarias
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
Orn	O	ornitina
Cit	U	citrulina
	X	cualquier aminoácido

Índice

Publicaciones	3
Agradecimientos	5
Abreviaturas	7
Aminoácidos	9

Introducción

Propiedades de los lípidos	15
Las proteínas intracelulares que unen lípidos	16
<i>Yarrowia lipolytica</i> : Una levadura con particular eficiencia en la utilización de lípidos	18
Las SLBP peroxisomales	21
La familia de genes SCP2 y su evolución	22
Características estructurales del motivo SCP2	25
Estructuras de rayos X reportadas de SCP2	27
Funciones biológicas asociadas a la SCP2	30
Objetivos de la tesis	31

Resultados

Obtención y caracterización preliminar de YLSCP2	33
Estabilidad y correcto plegado	34
Propiedades ópticas	35
Espectro de absorción UV	36

Estado de agregación	37
Unión de ácido parinámico	40
Detección de ligandos endógenos	42
Obtención y caracterización de YLSCP2 libre de ligandos contaminantes ...	44
Propiedades ópticas y correcto plegado	46
Espectro de absorción UV	47
Estado de agregación	48
Unión de ácido parinámico	50
Unión de ligandos no fluorescentes por desplazamiento de AP	52
Cristalización y Estructura	61

Discusión

Caracterización óptica e hidrodinámica de YLSCP2	69
Unión de ligandos	70
Estructura de rayos X de YLSCP2	71

Conclusiones

Materiales y Métodos

Biología Molecular

El gen de YLSCP2	77
Producción de bacterias competentes	77
Transformación de bacterias <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	78
Obtención y caracterización preliminar de YLSCP2	
Expresión de YLSCP2 en <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	78

Electroforesis	79
Obtención de cuerpos de inclusión	80
Purificación	80
Espectrometría de masa y secuenciación de proteínas	81
Estabilidad (tripsinólisis)	81
Propiedades ópticas de YLSCP2: Determinación de la concentración proteica (absorción UV) y espectroscopía de dicroísmo circular	82
Estado de agregación (comportamiento hidrodinámico)	83
Detección de ligandos endógenos	
Cromatografía en capa delgada	84
Caracterización funcional de YLSCP2	
Modelo para un sitio de unión	85
Unión de ácido parinárico	85
Unión de ligandos no fluorescentes por desplazamiento de ácido <i>cis</i> -parinárico	86
Desplazamiento de ácido <i>cis</i> -parinárico por ligandos que forman micelas	88
Cristalización, difracción y resolución de la estructura tridimensional de YLSCP2	90
Bibliografía	93

Introducción

Propiedades de los lípidos

Los lípidos son biomoléculas muy diversas. Están formados principalmente por una larga cadena alifática, aunque pueden también poseer una zona polar pequeña. Es esta cadena carbonada la responsable de la característica común y definitoria de estos compuestos: su escasa solubilidad en soluciones acuosas. Y es su heterogeneidad la que les permite cumplir funciones muy diversas.

Entre los lípidos más abundantes, las grasas y aceites son la reserva energética principal en animales y plantas, respectivamente. Los triglicéridos (TG) y los fosfolípidos (PL) son los principales componentes estructurales de las membranas biológicas. Los esteroides, además de regular la fluidez de estas membranas, también cumplen funciones como cofactores de transcripción, hormonas (testosterona, estradiol, cortisol, prostaglandinas, etc.) y agentes emulsionantes en el tracto digestivo (sales biliares). Además, algunos PL participan de procesos de reconocimiento celular y transducción de señales.

Otros roles fundamentales de los lípidos son como grupos prostéticos de proteínas (activación de la ghrelina por esterificación con ácido octanoico, anclaje de la clorofila por el fitol, anclaje a membrana por prenilación o por unión a glicosilfosfatidilinositol, transporte de electrones por la coenzima Q y su variable cantidad de unidades isopreno), vitaminas (A, D, E, K), segundos mensajeros (derivados de ácidos grasos poli-insaturados, esteroides y fosfolípidos) y moduladores de factores de transcripción de genes. En la membrana plasmática, PL y ácidos grasos (FA), ayudan a las proteínas a conservar su estructura, podría decirse, cumpliendo función de “chaperonas” de proteínas de membrana.

Además de su poder nutricional y mecánico, los fosfolípidos, esfingolípidos y ácidos grasos, por ejemplo, intervienen en la regulación del metabolismo, la diferenciación, la proliferación, la senescencia y muerte celular, la angiogénesis y la vasoconstricción [Cao, 2008; Duplus, 2000; Chawla, 2001; Funk, 2001; Hla, 2001; Merrill, 2002; Hannun, 2002].

La baja solubilidad en agua es el desafío central que la célula debe superar para la

utilización de los lípidos; ya que ésta dificulta su movilidad, intercambio, disponibilidad y transformación. Teniendo en cuenta, además, que los compuestos insolubles son tóxicos para la célula, la misma debe desarrollar mecanismos para eliminarlos o disolverlos.

Una vez dentro de la célula, los lípidos deben mantenerse solubles y, en las células eucariotas, deben ser transportados hacia las organelas.

Dada la amplia variedad de funciones que desempeñan los lípidos, es necesaria una precisa regulación de su metabolismo para mantener la homeostasis celular. Patologías como obesidad, diabetes, síndrome metabólico, aterosclerosis, trastornos de absorción y cáncer son sólo algunos ejemplos de enfermedades cuya aparición o progresión ha sido asociada a alteraciones en el metabolismo lipídico, cuando anteriormente eran adscriptas exclusivamente a proteínas [Lusis, 2000; Shulman, 2000; Kopelman, 2000; Shureiqi, 2001; Ding, 2003]. Finalmente, estos compuestos hidrofóbicos pueden ser metabolizados mediante diversos procesos como por ejemplo la β -oxidación de ácidos grasos.

Las proteínas intracelulares que unen lípidos

Para resolver los problemas derivados de la disolución, captación, transporte y toxicidad de los lípidos, han surgido por evolución diferentes familias de proteínas solubles intracelulares, capaces de unir lípidos en forma reversible, las SLBP (por sus siglas en inglés *Soluble Lipid Binding Proteins*). Dentro de este conjunto de proteínas, las familias y superfamilias mejor caracterizadas corresponden a las proteínas que unen ácidos grasos y ésteres de coenzima A (FABP y ACBP respectivamente de su siglas en inglés *Fatty Acid Binding Protein* [Storch, 2008] y *Acyl-CoA Binding Protein* [Kragelund, 1999]). También existen las proteínas transportadoras no específicas de lípidos (nsLTP, *non-specific Lipid Transfer Proteins*) [Kader, 1996], la proteína transportadora de esteroides tipo-2 (SCP2, *Sterol Carrier Protein-2*) [Edqvist, 2006], y una familia de proteínas llamadas CRAL_TRIO, que incluye a la proteína transportadora de fosfatidilinositol de levadura (SEC14) y la proteína transportadora de tocoferol (TTP) [Schaaf, 2008; Morley, 2008].

Las SLBP se encuentran ampliamente distribuidas en los tres dominios de la vida (*Eukarya*, *Bacteria* y *Archaea*). Por ejemplo, las nsLTP son específicas de plantas superiores. FABP, ACBP y SCP2 se expresan en animales, aunque las últimas dos también lo hacen en

hongos, arqueas, bacterias y plantas. Además, en organismos eucariotas superiores frecuentemente se encuentran representantes de varias de estas familias de proteínas coexistiendo en un mismo tipo celular, o incluso isotipos de una misma familia. Esto estaría indicando una especialización en las funciones de cada una o una redundancia funcional. Teniendo en cuenta la importancia del metabolismo lipídico para las células, probablemente se trate de una superposición funcional.

Por otro lado, las distintas SLBP difieren en su estructura, filogenia, localización tisular e intracelular y propiedades de unión de ligandos hidrofóbicos. Esto es fácil de entender en organismos pluricelulares donde se observa una división de tareas entre distintos tejidos o compartimentos intracelulares. Sin embargo, es interesante mencionar que distintos organismos unicelulares logran cumplir con todas sus funciones vitales con una dotación única de SLBP. Por ejemplo, se sabe que la levadura *Saccharomyces cerevisiae* expresa una sola SLBP perteneciente a la familia de la ACBP, y *Yarrowia lipolytica*, que posee una capacidad extraordinaria para metabolizar compuestos hidrofóbicos, posee sólo una perteneciente a la familia de la SCP2 [Dell'Angelica, 1992]. Esta distribución desigual en organismos relacionados podría estar sugiriendo también un solapamiento funcional entre distintos tipos de SLBP y justificar las diferencias observadas en relación al metabolismo lipídico de cada especie.

Aunque se dispone de una gran cantidad de información estructural y genómica, aún no está claro cuáles podrían ser las funciones específicas que estas SLBP estarían desarrollando. Dentro de cada familia de proteínas SLBP existen varias isoformas que presentan un patrón de expresión y especificidad de unión de ligandos hidrofóbicos únicos. Se cree que estas diferencias residen en una baja identidad de secuencia (tan sólo un 20%), a pesar de la cual adoptan estructuras tridimensionales muy similares.

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 funcionamiento celular. Como ya se dijo, las distintas SLBP difieren en su estructura (Fig. 1), filogenia, localización tisular e intracelular y espectro de unión de ligandos, presentando un panorama complejo para la interpretación de las funciones de estas proteínas.

Entre las SLBP podemos encontrar una familia con propiedades que abarcan las de todas las demás: las proteínas transportadoras de esteroides (SCP2). Las mismas unen un amplio grupo de lípidos incluyendo los ligandos de todas las SLBP y son las únicas presentes en todos los dominios biológicos. Nuevamente, en la levadura *Yarrowia lipolytica*, sólo una SLBP es expresada: una representante de la familia de las SCP2, la YLSCP2, la misma fue objeto de estudio en esta tesis.

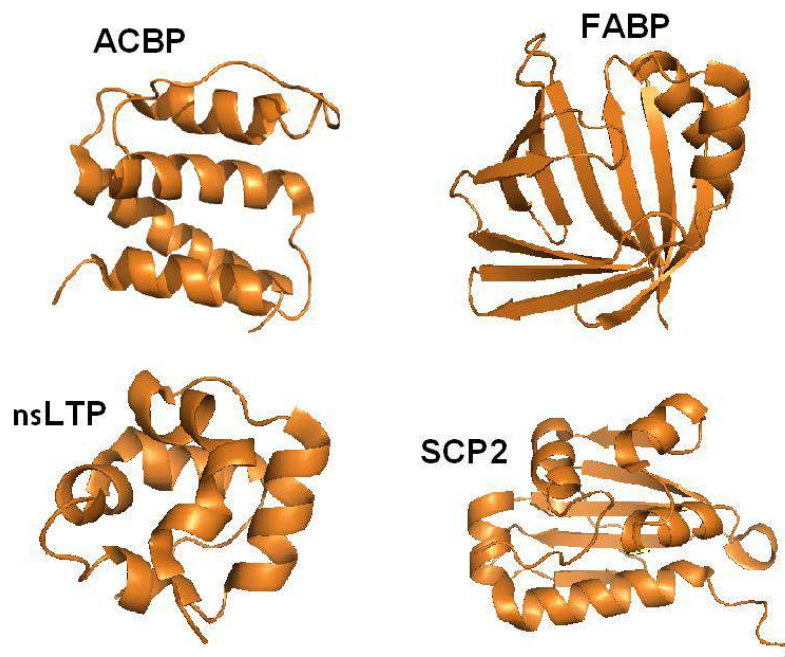


Figura 1. Estructuras representativas de SLBP. ACBP: proteína transportadoras de acil-CoA (PDB:1ACA), FABP: proteína transportadora de ácidos grasos (PDB:1DC9), nsLTP: proteína transportadora no específica de lípidos (PDB:1TUK) y SCP2: proteína transportadora de esteroides (PDB:1C44).

***Yarrowia lipolytica*: Una levadura con particular eficiencia en la utilización de lípidos**

La levadura ascomicete *Yarrowia lipolytica* es un hongo dimórfico cuya transición entre la forma micelar¹ y levaduriforme es regulada por la fuente de lípidos presentes en el medio

¹ Micelar en este caso refiere a micelios. Más adelante en la tesis, la palabra “micelar” referirá al fenómeno físicoquímico de formación de micelas.

de cultivo, entre otros factores [Mlčková, 2004]. Es una levadura aeróbica estricta, relativamente fácil de manipular por técnicas moleculares y genéticas. Además, presenta un metabolismo lipídico característico, ya que es capaz de degradar muy eficientemente gran variedad de sustratos hidrofóbicos empleando vías metabólicas específicas [Fickers, 2005]. Parte de esta capacidad depende de la modificación de la superficie celular, de la expresión de enzimas específicas y de la secreción de un conjunto de lipasas y emulsionantes al medio extracelular que hidrolizan parcialmente aceites. Si además tenemos en cuenta que las células de levaduras son muy similares a las de eucariotas superiores con respecto a la compartimentalización intracelular, *Y. lipolytica* se convierte en un excelente modelo para el estudio del metabolismo y transporte de lípidos.

Yarrowia lipolytica posee la capacidad de crecer a partir de alcanos lineales y FA como única fuente de carbono [Barth & Gaillardin, 1997]. Para esto son necesarios la interacción de la levadura con los sustratos hidrofóbicos, su asimilación y el transporte intracelular para luego ser oxidados en peroxisomas o almacenados como TG en forma de cuerpos lipídicos. También posee un sistema de β -oxidación inducible por ácidos grasos y *n*-alcanos [Fickers, 2005].

Mientras que en animales la degradación de los FA tiene lugar en mitocondrias y peroxisomas vía β -oxidación, en levaduras las enzimas de esta vía sólo están presentes en peroxisomas. Así, la oxidación de FA es un proceso de etapas múltiples que requiere diferentes actividades enzimáticas. Los hidrocarburos deben ser oxidados previamente a alcoholes y luego a los FA correspondientes para entrar en esta vía. La primera reacción, y etapa limitante del proceso, es la catalizada por una acil-CoA oxidasa peroxisomal (AOX o POX) y las características sobresalientes de *Y. lipolytica* podrían en parte deberse a estas enzimas. *Saccharomyces cerevisiae* posee sólo una AOX, mientras que *Y. lipolytica* se diferencia por poseer cinco isoformas diferentes. Además, la modificación de la expresión de estas enzimas en *Y. lipolytica* afecta la asimilación de las gotas de lípidos así como el número y el tamaño de los cuerpos lipídicos intracelulares [Barth & Gaillardin, 1997].

Para poder utilizar lípidos tan eficientemente, *Y. lipolytica* debe ser capaz de sintetizarlos y/o captarlos con gran eficiencia. En el caso de la síntesis endógena participan un conjunto de enzimas citosólicas a partir de acetil-CoA: acetil-CoA carboxilasa (ACC), ácido graso

sintetasa (FAS), elongasas y desaturasas. Esta vía produce primeramente ácido palmítico (16:0), el cual luego puede funcionar como sustrato de las elongasas, transformándose entonces en ácido esteárico (18:0) [Jayakumar, 1995; Matsuzaka, 2002]. Los FA saturados palmítico y esteárico son los principales sustratos de la esteroil-CoA desaturasa o $\Delta 9$ -desaturasa (SCD), que introduce una insaturación en configuración *cis* entre los átomos C9 y C10 generando los FA monoinsaturados palmitoleico (16:1 n-7) y oleico (18:1 n-9) [Enoch, 1976]. Normalmente, el exceso de hidratos de carbono asimilados, que no pueden guardarse como glucógeno, se transforma en lípidos de reserva que formarán TG.

En el caso de la incorporación exógena de sustratos hidrofóbicos existen dos hipótesis para explicar el transporte de sustratos poco miscibles en agua. Como ya se mencionó, en *Y. lipolytica* se han encontrado evidencias de ambos mecanismos, producción de surfactantes que disuelven sustratos hidrofóbicos [Cirigliano, 1984; Zinjarde, 2002]; y la inducción de adhesión directa a su pared celular por aumento de las propiedades apolares de la superficie celular durante el crecimiento con sustratos hidrofóbicos [Kim T.H., 2000].

En levaduras, la vía de β -oxidación se lleva a cabo sólo en peroxisomas (vía que se encuentra mucho más ampliamente distribuida en la naturaleza, en comparación a la β -oxidación mitocondrial que está restringida al reino animal [Wanders, 2001]). Para mediar en la transferencia de lípidos y participar en el metabolismo de los mismos, las proteínas peroxisomales deben ser a su vez direccionadas para su localización en los peroxisomas, ya que todas las proteínas peroxisomales se sintetizan en el citoplasma.

Para llevar a cabo esta tarea existen dos secuencias de direccionamiento a peroxisomas, la PTS1 (Ser-Lys-Leu) que se ubica en el extremo N-terminal, y la PTS2 (R/K)(L/V/I)X₅(H/Q)(L/A) que además puede ser interna [Hettema, 1999]. Las secuencias PTS1 y PTS2 interaccionan con dos proteínas integrales de membrana peroxisomal, la PEX5p y PEX7p respectivamente [Brown, 2003]. Así se incorporan al peroxisoma todas las enzimas necesarias para el metabolismo de lípidos (Fig. 5d).

Tanto los ácidos grasos endógenos como los exógenos son activados por la unión a coenzima A (CoA) como primer paso necesario. Esto es llevado a cabo por la acil-CoA sintetasa. Esta conversión permite el transporte a peroxisomas y allí los acil-CoA ingresan

en la vía de la β -oxidación. Esta ruta termina produciendo acetil-CoA, propionil-CoA y precursores del ciclo de Krebs y está catalizada por tres enzimas, la acil-CoA oxidasa, la proteína multifuncional hidratasa-deshidrogenasa y la tiolasa [Fickers, 2005].

También son metabolitos de la β -oxidación peroxisomal los ácidos grasos con poli-insaturaciones, ácidos grasos ramificados, ácidos dicarboxílicos y prostaglandinas. Dentro de los peroxisomas se lleva a cabo también el ciclo del glioxilato (Fig. 2).

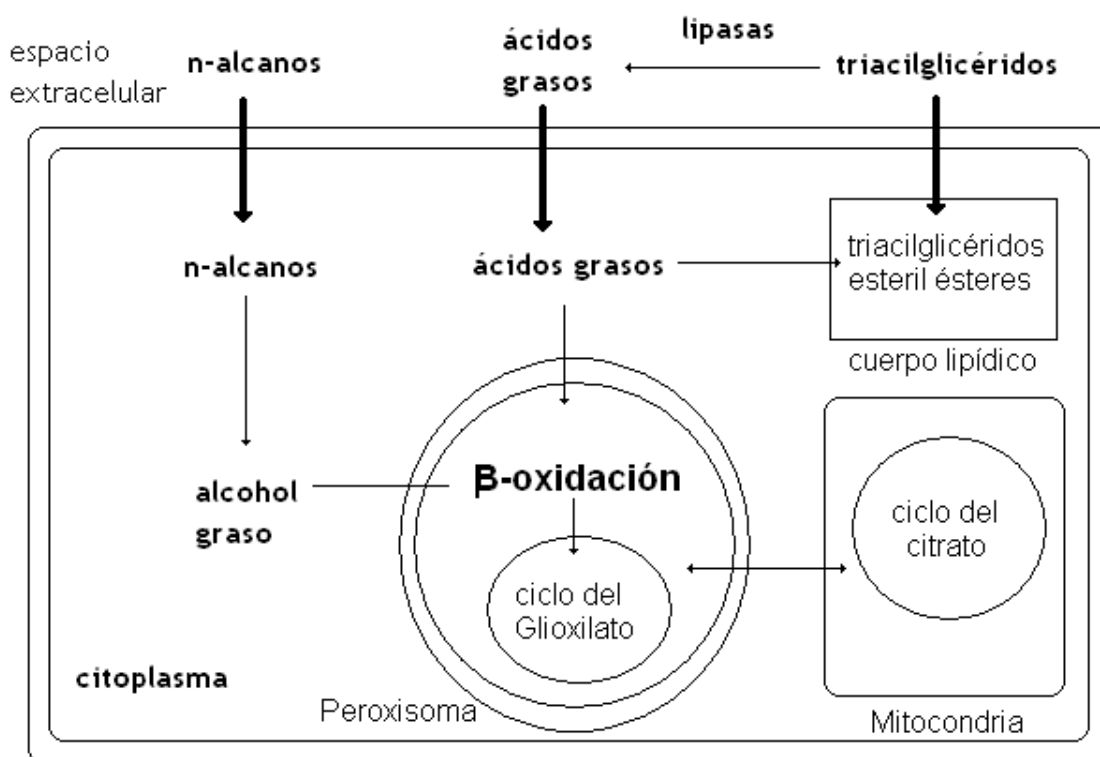


Figura 2. Esquema del catabolismo de n-alcanos, ácidos grasos y triacilglicéridos en *Y. lipolytica*.

Las SLBP peroxisomales

Una vez incorporados al peroxisoma, los lípidos deben ser mantenidos solubles y disponibles para su utilización metabólica. La única SLBP conocida con el potencial de cumplir esta función es la SCP2. Esto es así porque SCP2 en general posee una secuencia de direccionamiento a peroxisoma. En células de mamíferos una fracción importante de SCP2 se localiza en peroxisomas. En insectos, alguna de las isoformas conocidas de SCP2 son peroxisomales. En levaduras y en particular en *Y. lipolytica*, las SCP2 conocidas han

sido descriptas como peroxisomales [Tan, 1994; Ferreyra, 2006].

Pero a pesar de la gran cantidad de información disponible, la función específica que cumplen las SCP2 todavía es un enigma. Un ejemplo de ello es que en *Saccharomyces cerevisiae*, y *Saccharomyces pombe* no hay SCP2 y a pesar de ello el metabolismo de ácidos grasos es relativamente normal.

En mamíferos se ha descripto la presencia, en peroxisomas, de otras proteínas transportadoras de ácidos grasos, como la L-FABP [Antonenkov, 2006], sin embargo en levaduras SCP2 continúa siendo la única candidata conocida a cumplir el rol de transportadora peroxisomal de lípidos.

Concomitante con el secuenciamiento del genoma completo de *Yarrowia lipolytica* [Dujon, 2004], en el laboratorio donde se desarrolló esta tesis se clonó la SCP2 de esta levadura (YLSCP2), y se estudió su estructura, plegado, especificidad de ligandos y demás características biofísicas con el fin de esclarecer este tema [Ferreyra, 2006]. Es importante destacar una vez más que *Y. lipolytica* constituye un sistema de particular interés, ya que combina una capacidad metabólica extraordinaria con una dotación limitada de SLBP, en comparación por ejemplo con células de tejidos de mamíferos. Estos tejidos deben manejar grandes cantidades de lípidos y se especializan en tres funciones que también son bien desempeñadas por las células de esta levadura, como son la asimilación de lípidos, su metabolismo, y la síntesis y almacenamiento de TG.

La familia de genes SCP2 y su evolución

Luego de comprobar la gran diversidad de ligandos hidrofóbicos que esta proteína es capaz de unir, la SCP2 de mamíferos se denominó proteína transportadora no específica de lípidos. Pero finalmente en la bibliografía se impuso su denominación original, proteína transportadora de esteroides, a pesar de su amplia capacidad de unir lípidos, tales como, esteroides, isoprenoides, PL, lisofosfolípidos, etc. Posteriormente se comprobó su capacidad de unir FA de cadena larga y acil-CoA con afinidades similares a las FABP y ACBP. Además, el dominio SCP2 forma parte de una familia multigénica de proteínas multidominio presentes en todos los dominios de la vida, enzimas relacionadas al metabolismo de FA (tiolasas, hidratasas y/o deshidrogenasas), presentes en particular en el

compartimiento peroxisomal.

En animales y un gran número de eucariotas, el dominio SCP2 está fusionado, normalmente en el extremo C-terminal. Por ejemplo, en humanos hay cinco genes que incluyen este dominio en proteínas: *scpx*, *C20orf79*, *hsd17B4*, *hsdl2* y *stoml1*; pero en plantas y hongos, también existe un gen que codifica para una SCP2 sin fusionar. Los últimos tres genes humanos codifican para una serie de proteínas relacionadas al metabolismo de FA y demás lípidos [Adamski, 1995; Dai, 2003; Seidel, 1998]. Así, el dominio SCP2 es expresado como una parte integral de las proteínas DBP (80 kDa), HSDL2 (45 kDa) y STOML1 (43 kDa). Por otro lado, el gen *scpx* codifica para la proteína SCPX (58 kDa) que posee un dominio con actividad 3-cetoacil-CoA tiolasa fusionado al dominio SCP2 en el C-terminal [Ohba, 1994]. Esta proteína cataliza el último paso de cada ciclo de β -oxidación. Gracias a la existencia de un promotor alternativo en el gen *scpx*, se expresa también la proteína preSCP2 independientemente, que consiste en el dominio SCP2 como proteína aislada [Ohba, 1995], con la secuencia de localización peroxisomal PTS1, más una secuencia N-terminal de unos 30 aminoácidos que es removida durante su maduración. Esta misma modificación postraducciona puede ocurrir sobre la SCPX, y hasta ahora, en mamíferos, se creía que así se obtenía el 100% de la SCP2 independiente, por proteólisis postraducciona de los productos de transcripción del gen *scpx* (Fig. 3). Sin embargo más recientemente se ha descubierto un gen no caracterizado aún, el *C20orf79* que codifica una SCP2 de dominio único de 156 residuos aminoacídicos [Deloukas, 2001].

Proteínas multidominio similares a las de mamífero también han sido identificadas en otros organismos eucariotas como el nematode *Caenorhabditis elegans*, el hongo *Arbuscular mycorrhizal* o amebas de la especie *Dictyostelium spp.* [Barnes, 1996; Requena, 1999; Matsuoka, 2003]. Así mismo, el vector transmisor de la fiebre amarilla *Aedes aegypti* expresa la SCPX y varias proteínas tipo SCP2 sin fusionar [Lan, 2004; Krebs, 2003]. Sin embargo, en plantas [Edqvist, 2004], en levaduras [Szabo, 1989; Hwang, 1991, Ferreyra, 2006], en arqueas [Kawashima, 2000], y en bacterias, la SCP2 parece ser codificada como una proteína de dominio único, resultado de genes no fusionados (Tabla 1). Así, las SCP2 de plantas, hongos y vertebrados se estima aparecieron por fisión de un gen ancestral que codificaba para una proteína que contenía los dominio de la D-3-hidroxiacil-CoA

deshidrogenasa y de la SCP2 [Edqvist, 2006].

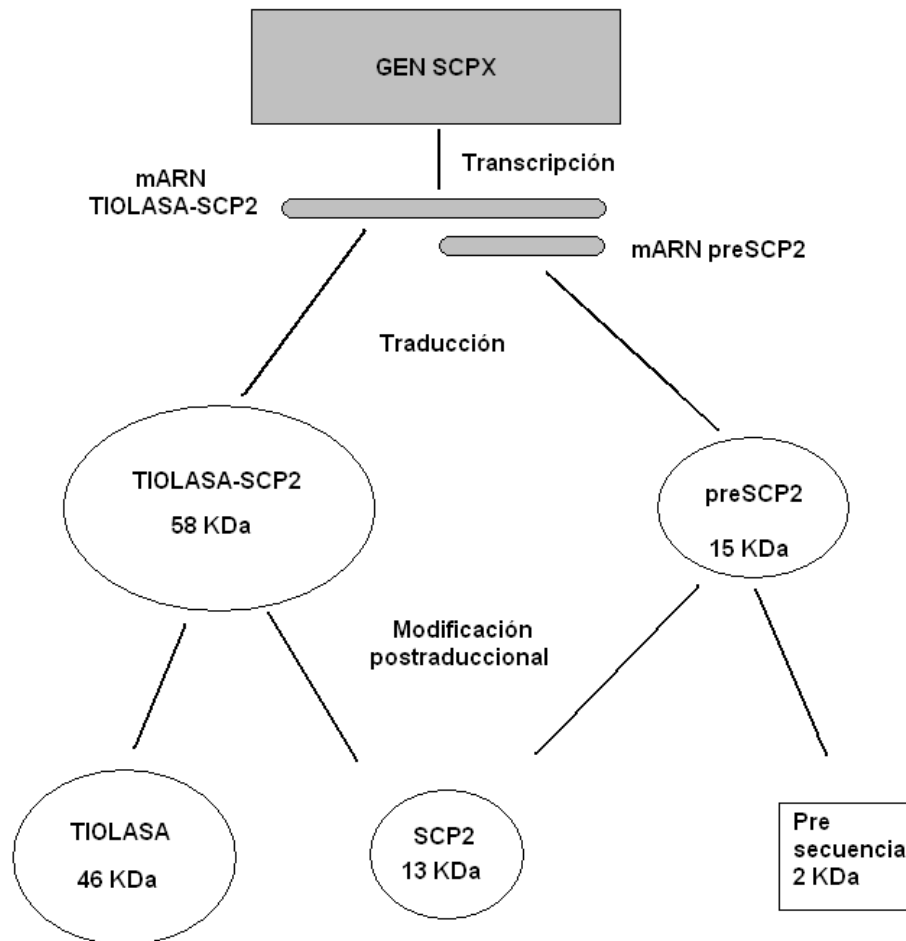


Figura 3. Esquema de los productos proteicos obtenidos a partir del gen scpx de humanos. Los ARN mensajeros codifican para TIOLASA-SCP2 y preSCP2, a partir de ambas proteínas se obtiene SCP2 madura luego de una proteólisis.

Organismo	Gen	Proteína	Dominios
<i>H. Sapiens</i>	hsd17B4	MFE2 (DBP)	H-C-S
	scpx	SCPX	T-S
	hsdl2	HSDL2	D-S
	stoml1	STOML1	E-S
	C20orf79	SCP2	S
<i>C. Elegans</i>	dhs-28	DBP	H-S
	dhs-6	HSDL2	T-S

	unc-24	UNC-24	D-S
	nlt-1	SCP2	S
<i>A. gambiae</i>	ENSANGG00000011810	ENSANGP00000014299	H-C-S
	ENSANGG00000007479	ENSANGP00000009968	T-S
	ENSANGG00000013825	ENSANGP00000016314	D-S
	ENSANGG00000018004	ENSANGP00000020493	S
	ENSANGG00000022459	ENSANGP00000026507	S
	ENSANGG00000017981	ENSANGP00000020470	S
<i>C. tropicalis</i>	pox 18	PXP 18	S
<i>G. mosseae</i>	beg 12	GMFOX2	H-H-C-S
<i>T. gondii</i>	tghad2scp2	TGHAD2SCP2	H-S-S
<i>D. discoideum</i>	mfeA	MFE 1 (DBP)	H-S
	Gen ID: 3390058	DDBDRAFT_0186139	S-S
<i>A. thaliana</i>	atscp2	ATSCP2	S
<i>T. thermophilus</i>	Gen ID: 3168635	TTHA0401	S

Tabla 1. 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 arqueas (*T. thermophilus*). Clave de dominios: D-3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (H), enoil-CoA hidratasa (C), SCP2 (S), tiolasa (T), deshidrogenasa de cadena corta (D), estomatina (E) [Edqvist J., 2006].

Características estructurales del motivo SCP2

El estudio de la estructura de una familia de proteínas nos brinda información sobre los mecanismos de acción y estabilidad de la misma. Por eso es de suma importancia estudiar la familia SCP2. La SCP2 es una proteína que presenta una estructura claramente distinta a la de la familia FABP. Presenta un motivo de plegado tipo $\alpha + \beta$ compuesto por cinco cordones β formando una lámina y cinco hélices α (Fig. 4). En el extremo N-terminal de la SCP2, existen unos 32 residuos que forman una hélice α anfipática. La misma participaría en la interacción con membranas fosfolipídicas aniónicas debido a los residuos aminoacídicos con carga positiva. La cara hidrofóbica de esta hélice junto con los cordones $\beta 4$ y $\beta 5$ y la hélice $\alpha 5$ forman una cavidad con la capacidad de unir ligandos hidrofóbicos

de estructuras muy variadas como FA, acil-CoA, colesterol, PL, isoprenoides, etc. La mayoría de las SCP2 parecen tener un único sitio de unión, independientemente del tipo de ligando, aunque la orientación no es la misma cuando se comparan las estructuras de distintos *phyla*. Así, la unión del detergente Tritón X-100 en la SCP2 humana y los FA en la SCP2 de mosquito tienen orientaciones casi ortogonales. La estructura dimérica de las proteína tipo SCP2-2 (SCP2L2) de mosquito mostró ser muy flexible, con un segundo sitio en uno de los monómeros y con una orientación ortogonal al primero [Dyer, 2008].

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 SCP2 también indican una flexibilidad conformacional alta [Filipp, 2007; Baxter, 1998; Stolowich, 2002].

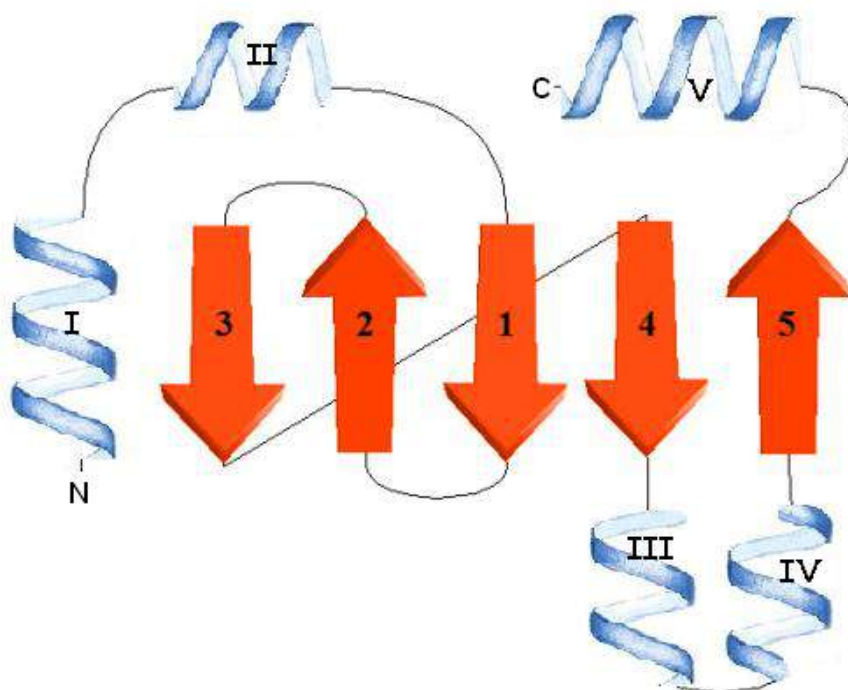


Figura 4. Esquema general del motivo estructural de las proteínas transportadoras de esteroides (SCP2). Se representa el orden de las hélices α (hélices azules) con números romanos y de los cordones β (flechas rojas) con números cardinales y se indican los extremos N-terminal (N) y C-terminal (C).

Estructuras de rayos X reportadas de SCP2

La primera estructura 3D de SCP2 resuelta por difracción de rayos X fue la SCP2 de conejo (CSCP2) con una resolución de 1.8 Å (1C44) [Choinowski, 2000]. Su plegado presenta un motivo $\alpha + \beta$ formado por cinco cordones β y cinco hélices α , las cuales forman una cavidad hidrofóbica que podría ser el sitio de unión de ligandos (Fig. 5).

La primera estructura de un complejo de SCP2 con un ligando fue la del dominio SCP2 de la enzima multifuncional MFE2 de humanos (MFE2SCP2) con Tritón X-100 (1IKT) [Haapalainen, 2001]. Obtenida con una resolución de 1.75 Å, la estructura de mfe2SCP2 está compuesta por cinco cordones β y cinco hélices α formando una cavidad hidrofóbica que corta transversalmente a la proteína (Fig. 5). Esta cavidad conforma el sitio de unión de ligandos y se encuentra ocupada por una molécula del detergente Tritón X-100.

La siguiente estructura de SCP2 en complejo con un ligando determinada fue la del complejo entre SCP2 del mosquito de la fiebre amarilla *Aedes aegypti* (AESCP2) y una molécula de ácido palmítico (1PZ4) [Dyer, 2003]. Su resolución fue de 1.35 Å. El plegado de AESCP2 es muy similar al de HSCP2 y CSCP2, consistiendo en una lámina de cinco cordones β cubiertos por cuatro hélices α (Fig. 5). Sin embargo, los residuos que forman la hélice α_2 en otras SCP2 (HSCP2, CSCP2 y MFE2SCP2) no presentan estructura secundaria en AESCP2. La orientación del ácido graso es diferente a la reportada para el Tritón X-100 unido a MFE2SCP2 [Haapalainen, 2001]. Este resultado fue el primero en mostrar la flexibilidad conformacional del sitio de unión de la familia de proteínas SCP2. Además, se puede observar que la cavidad que forma el sitio de unión tiene forma de L.

La siguiente estructura fue la SCP2 humana, HSCP2, correspondiente al dominio SCP2 de la proteína de fusión SCPX de humanos (Fig. 5) en complejo con el receptor peroxisomal peroxina-5 de humanos (PEX5p). La estructura del complejo fue determinada con una resolución de 2.3 Å (2C0L) [Stanley, 2006]. hSCP2 presenta cinco hélices α y cinco cordones β , la secuencia PTS1 ubicada en el extremo C-terminal se encuentra interaccionando con PEX5p [Filipp, 2007] (Fig. 5).

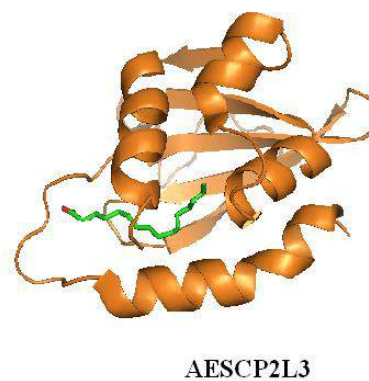
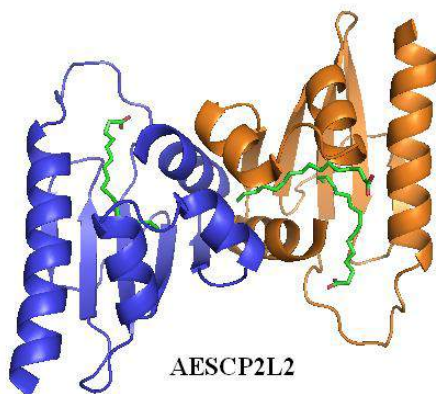
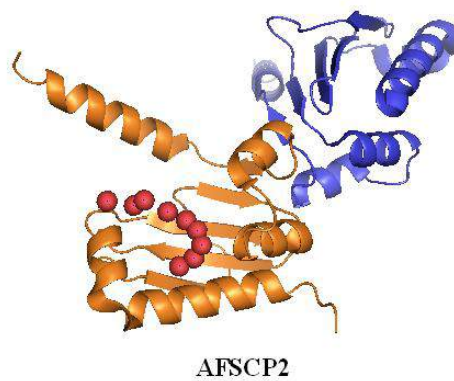
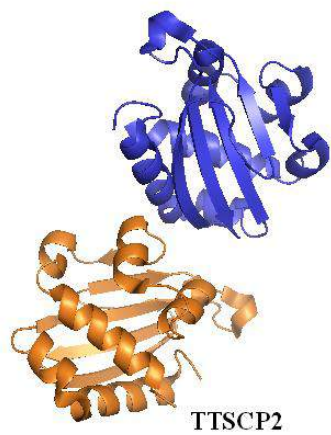
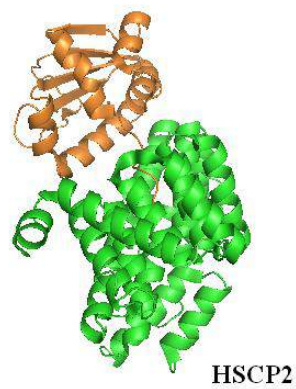
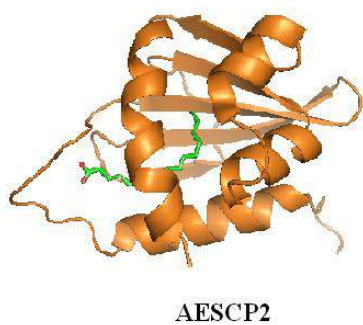
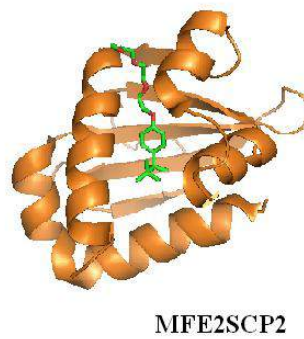
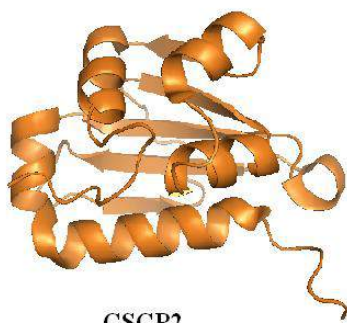


Figura 5. Estructuras tridimensionales resueltas para las SCP2 de humano (HSCP2: 2C0L, y MFE2SCP2: 1IKT), conejo (CSCP2: 1C44), mosquito (AESC2: 1PZ4, AESCP2L2: 3BDQ, y AESCP2L3: 3BKR) y arqueas (TTSCP2: 2CX7, y AFSCP2: 3BN8). Las SCP2 se representan en naranja y azul y la PEX5p en verde. Los ligandos unidos se muestran como barras (verde: carbono, rojo: oxígeno).

Las SCP2 de las arqueas *Thermus thermophilus* HB8 (TTSCP2) y *Archaeoglobus fulgidus* (AFSCP2), presentan las mismas características estructurales reportadas para otras SCP2 (Fig. 5), aunque la orientación de la hélice $\alpha 5$ es diferente al resto de SCP2. La estructura de TTSCP2 fue determinada con una resolución de 1.75 Å (2CX7) [Goroncy, 2010], mientras que la de AFSCP2 fue de 2.11 Å (3BN8) [3BN8, 2007]. 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. Cabe destacar que en AFSCP2 pudo observarse la presencia de un ligando no identificado (indicado en esferas bordó en la Fig. 5) solo en una de las moléculas de proteína de la celda unitaria (situación similar a la que se discutirá en esta tesis para YLSCP2).

Más recientemente fue determinada la estructura de la proteína tipo SCP2 de *A. aegypti* (AESC2L2) en complejo con tres moléculas de palmitato (2QZT) [Dyer, 2008], con una resolución de 1.7 Å. AESCP2L2, exhibe un plegado $\alpha + \beta$ con cinco cordones β antiparalelos y cuatro hélices α (Fig. 5). En la celda cristalográfica de AESCP2L2 se observa una estructura dimérica formada por la interacción de los extremos C-terminal. En este homodímero de AESCP2L2 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 reporte de la estructura de una SCP2 dimérica en complejo con ligandos, estaría indicando que la familia SCP2 tiene un modo de interacción con ligandos muy diverso. Este dímero no es un fenómeno artificial inducido por el proceso de cristalización ya que el mismo fue detectado *in vivo* en el mosquito [Dyer, 2009]. El homodímero formado tiene una superficie de contacto de 663 Å², equivalente al 10% de la superficie total de AESCP2L2.

Y por último previo a esta tesis, fue identificado un nuevo miembro SCP2-L de *A. aegypti* (AESC2L3). La estructura de AESCP2L3 con una molécula de palmitato unida fue determinada con una resolución de 1.4 Å (3BKR) [Dyer, 2009]. Esta proteína presenta la conformación estructural característica de las SCP2 y la posición de la molécula de ácido

graso es similar a la reportada para AESCP2 (Fig. 5).

Funciones biológicas asociadas a la SCP2

Las proteínas SCP2 de mamíferos y demás animales han sido ampliamente estudiadas, y gracias a la gran recopilación de información disponible se está comenzando a comprender el rol específico que podrían desempeñar estas proteínas *in vivo*. Quizás la propuesta más aceptada es que cumplirían la función de transportadoras intracelulares no específicas de lípidos, debido a su expresión ubicua y el amplio rango de ligandos que pueden unir. Menos clara está aún la función que cumplirían las SCP2 en plantas y microorganismos. Como al resto de las SLBP, se las asocia a procesos en los que el transporte de lípidos entre distintos compartimentos intracelulares o rutas metabólicas sea de crítica importancia. Basados en los resultados publicados en los últimos años, se han propuesto la siguiente serie de funciones para la SCP2 [Gallegos, 2001; Zheng, 2008; Niki, 1994]:

- Selección, unión, solubilización, transporte y compartimentalización de un amplio rango de lípidos en el citoplasma (isoprenoides, colesterol, PL, FA y acil-CoA entre otros).
- Transporte vectorial de lípidos hacia estructuras subcelulares o rutas metabólicas específicas.
- Participación en el catabolismo de FA ramificados en el peroxisoma (junto a las proteínas DBP y SCPX, fusionadas al dominio SCP2).
- Cofactor o activador de enzimas del metabolismo lipídico (síntesis de PL, TG, etc.).
- Participación en mecanismos de transducción de señales, incluyendo la regulación de la expresión génica relacionada al metabolismo de lípidos.
- Regulación de los procesos relacionados al metabolismo de colesterol y la regulación de sus niveles en membrana plasmática, incluyendo su interacción con caveolas.
- Chaperona.
- Compensación por la falta de proteínas de la familia FABP.

Actualmente se cuenta con gran cantidad de información que apoya la hipótesis de que cada una de las SLBP cumpliría funciones diferentes contribuyendo a la homeostasis celular y

sistémica. Alteraciones en la estructura o el patrón de expresión de estas proteínas puede tener efectos locales o sistémicos, no sólo confinados al metabolismo de lípidos, sino también a procesos de diferenciación, proliferación, muerte celular, transducción de señales y regulación de la expresión génica; tanto en forma directa como indirecta a través de mensajeros lipídicos. Todos procesos que podrían derivar en patologías como diabetes, aterosclerosis, lipotoxicidad, obesidad, cáncer o mal de Alzheimer [Olofsson, 2009; Olofsson, 2009; Michel, 2009; Zucker, 2000; Canevari, 2007].

Las SCP2 han sido estudiadas mayormente en mamíferos, organismos donde se expresan otras SLBP y otras enzimas multidominios que poseen uno o más dominios SCP2 [Gallegos, 2001]. Estos sistemas de estudio no son los mejores para determinar la relevancia biológica de las SCP2 debido a su complejidad y a la presencia de múltiples SLBP con potencial superposición de funciones.

Un mejor sistema para el estudio del metabolismo de lípidos es la levadura *Yarrowia lipolytica*, la cual posee una alta capacidad de consumo de compuestos hidrofóbicos y sólo cuenta con una SLBP: la SCP2 [Fickers, 2005; Dell'Angelica, 1996]. Nuestro laboratorio identificó y aisló la proteína transportadora de esteroides de *Yarrowia lipolytica* (YLSCP2), y su caracterización podría develar la función de esta familia de proteínas en el metabolismo de lípidos.

Objetivos de la tesis

El objetivo general de este trabajo de tesis es profundizar la caracterización estructural y funcional de YLSCP2 y aportar datos experimentales que permitan avanzar en la identificación y comprensión de la actividad biológica de la misma. Los objetivos específicos son la preparación de la forma apo de SCP2, la determinación de la constante de afinidad por una variedad de ligandos, la cristalización de la proteína y la determinación de su estructura por difracción de rayos X.

Resultados

Obtención y caracterización preliminar de YLSCP2

La YLSCP2 recombinante se preparó en *Escherichia Coli* BL21 conteniendo el vector *pET9bylscp2*. La proteína se produce en forma insoluble como cuerpos de inclusión. En un gel (SDS-PAGE) típico de las fracciones obtenidas en la preparación de YLSCP2 puede apreciarse que en los lavados de cuerpos de inclusión se pierde algo de YLSCP2 (Fig. 1). Sin embargo, aún así la purificación final resulta en grandes cantidades de la misma. El rendimiento final normalmente fue de 15 mg de proteína por litro de cultivo.

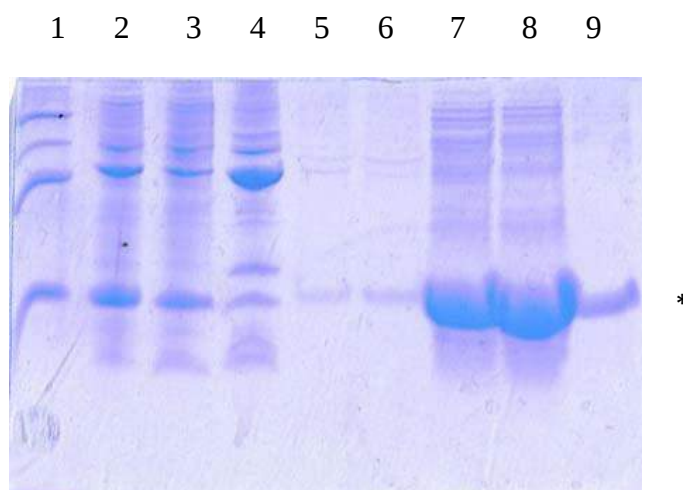


Figura 1. SDS-PAGE de las fracciones de purificación de YLSCP2. Calle 1, marcadores de peso molecular (66, 44, 32 y 14 kDa). Calles 2 a 4, sobrenadantes de CI 3 a 5, respectivamente. Calle 5, no retenido de la IEC. Calles 6 a 9, fracciones de la IEC 0, 0.25, 0.5 y 2 M NaCl, respectivamente. El asterisco indica la movilidad electroforética de YLSCP2.

Las fracciones reunidas luego de la cromatografía de intercambio iónico contienen algunos contaminantes, no obstante, luego de la diálisis, prácticamente todos los contaminantes (y parte de la YLSCP2) precipitan dejando a la proteína altamente pura (Fig. 2).

Para conocer la pureza de la preparación se corrió un gel de poliacrilamida. Teniendo en cuenta que la sensibilidad del *Coomasie*[®] *Brilliant Blue* es de 0.1 µg se sembraron cantidades crecientes de YLSCP2 replegada y se tomó nota de la calle en que apareció la primera contaminación (y de la masa de YLSCP2 en dicha calle, 15 µg, Fig. 2). Con estos valores se calculó que la pureza era de al menos el 99% (ver “Materiales y Métodos”).

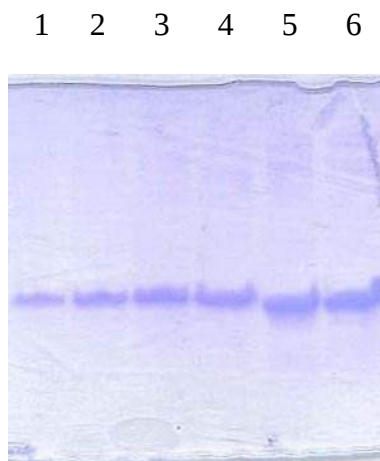


Figura 2. SDS-PAGE de YLSCP2 replegada. En las calles 1 a 6, se sembraron 2, 4, 8, 10, 15 y 17 μ g de YLSCP2, respectivamente. En la calle 5 (15 μ g) se detectó la primer banda contaminante, lo que permite establecer el alto grado de pureza de la preparación (ver texto).

Estabilidad y correcto plegado

Con el fin de evaluar cualitativamente la estabilidad y el plegado de YLSCP2 se efectuó una digestión proteolítica controlada (Fig. 3). El fundamento de esta determinación es que las proteínas parcial o incorrectamente plegadas suelen degradarse muy rápidamente en presencia de trazas de proteasas. En el experimento la relación YLSCP2:tripsina en masa fue 100:1.

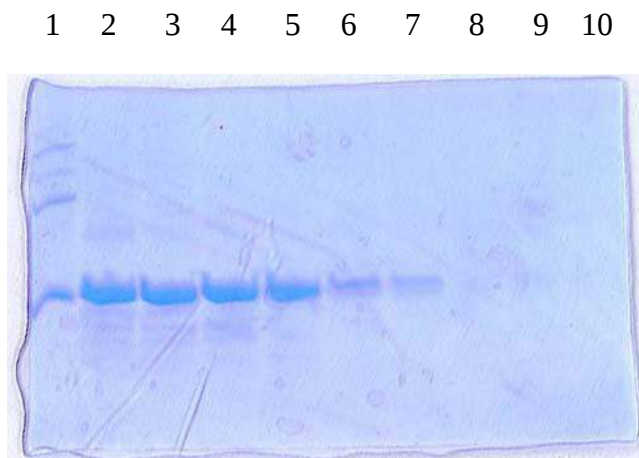


Figura 3. Tripsinólisis controlada de YLSCP2 seguida por SDS-PAGE. Calle 1, marcadores de peso molecular (66, 44, 32 y 14 kDa). Calles 2 a 10, tripsinólisis interrumpida luego de 0, 6, 14, 30, 60, 120, 180, 240 y 300 minutos. En todas las calles se sembraron 17 μ g de YLSCP2.

Puede apreciarse que en las condiciones ensayadas, la proteína soporta aproximadamente 30 minutos sin degradarse significativamente.

Propiedades ópticas

Con el fin de realizar una caracterización biofísica de la YLSCP2 obtenida, se realizaron espectros de dicroísmo circular en el UV lejano y cercano. Los resultados se muestran en las Figs. 4 y 5. Ambos espectros de dicroísmo circular muestran un contenido de estructura característico de una proteína bien plegada. El espectro de CD en el UV lejano (Fig. 4) se asemeja al de las proteínas que contienen estructuras α y β combinadas.

En el UV cercano, el espectro de CD de YLSCP2 muestra una intensa banda dicroica positiva en la región de los residuos de fenilalanina y tirosina. En la región donde aparecen las bandas correspondientes al triptofano (295 y 300 nm) se aprecia una banda negativa (Fig. 5). Estas características espectrales son distintivas de esta proteína [Ferreira, 2006].

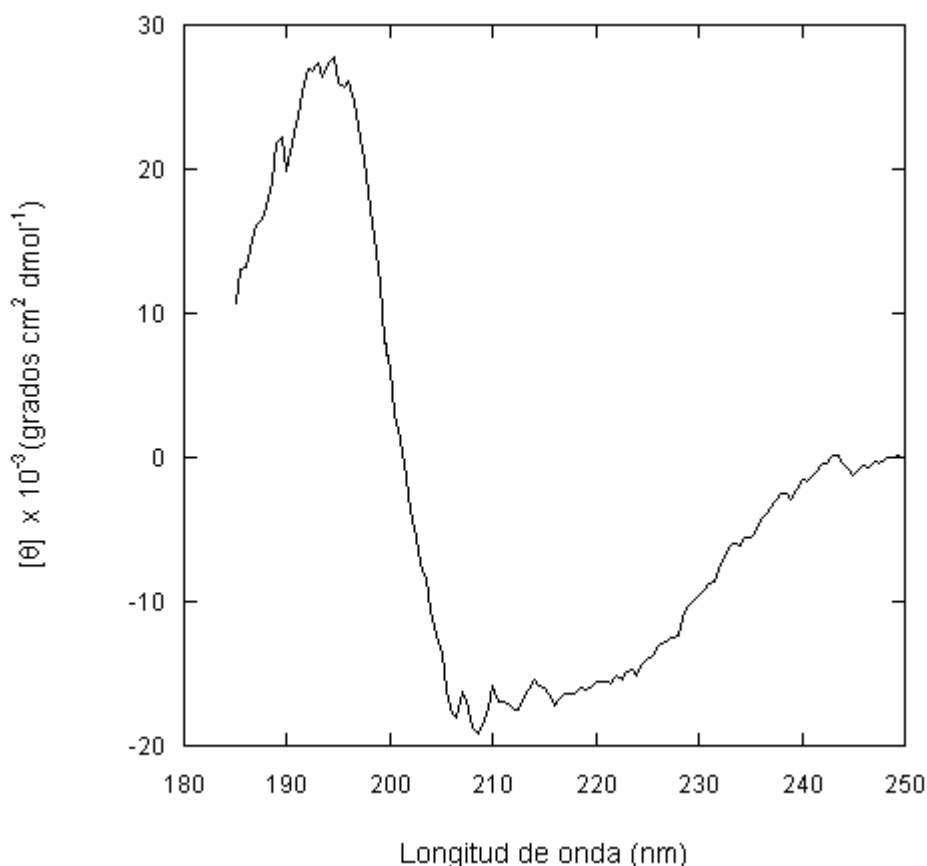


Figura 4. Espectro de dicroísmo circular de YLSCP2, en el UV lejano.

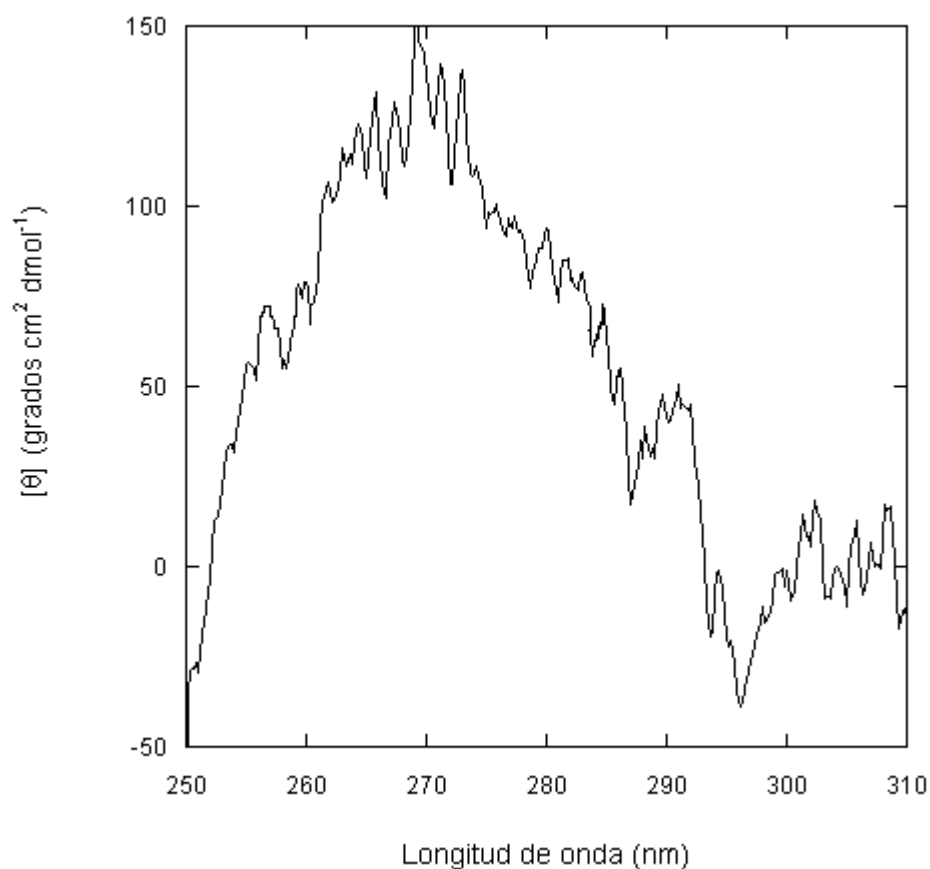


Figura 5. Espectro de dicroísmo circular de YLSCP2, en el UV cercano.

Espectro de absorción UV

Normalmente, los espectros de absorción UV son poco sensibles a los detalles conformacionales. Sin embargo, en este caso, los espectros UV resultaron muy útiles para detectar fracciones parcial o incorrectamente plegadas durante la preparación de la proteína.

El espectro de la proteína bien plegada presenta los picos de tirosina (290 nm) y triptófano (280 nm) bien definidos, como así también los producidos por las cinco fenilalaninas (260 a 280 nm). Además algo característico es que la absorbancia a 240 nm es superior al pico a 280 nm (Fig. 6). Mientras que el espectro de YLSCP2 parcialmente plegada no muestra ninguno de estos picos bien definidos, y la absorbancia a 240 nm es aproximadamente la misma que a 280 nm (Fig. 6).

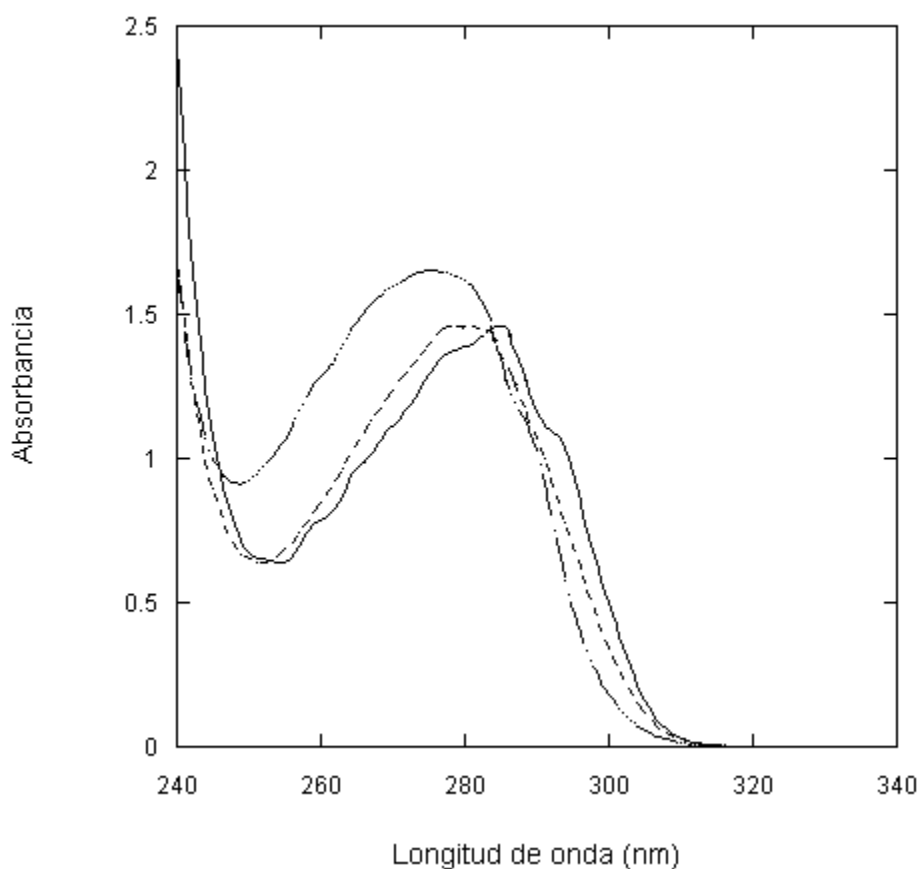


Figura 6. Espectros de absorción electrónica de YLSCP2. La concentración proteica fue de 3 mg/mL, en todos los casos. La línea sólida corresponde a YLSCP2 replegada correctamente. La curva con guiones corresponde a YLSCP2 desplegada en urea 8 M, y la línea con rayas y puntos corresponde a YLSCP2 parcialmente plegada.

Estado de agregación

Para establecer el estado de agregación de la proteína se realizó una cromatografía de exclusión molecular (SEC-FPLC) utilizando una columna Superdex™ 75. Para obtener la curva de calibración se utilizó BSA (66.3 kDa), β -lactamasa (29.45 kDa), nucleasa de estafilococo (18 kDa), mioglobina (16.8 kDa), RNAsa (13.7 kDa) y aprotinina (6.5 kDa). Usando la calibración se pudo calcular que el R_s de YLSCP2 fue de 18.8 Å, lo que corresponde a un PM de 13.900. Esto es, muy cercano al esperado para una proteína del tamaño de la YLSCP2 en estado monomérico [Uversky, 1993]. El valor esperado para un dímero de YLSCP2 es de 24.2 Å.

Las corridas de exclusión molecular en la Superdex™ 75 se realizaron sembrando distintas concentraciones de proteína (2-500 μ M) y siempre se obtuvo el mismo tiempo de retención (Fig. 7).

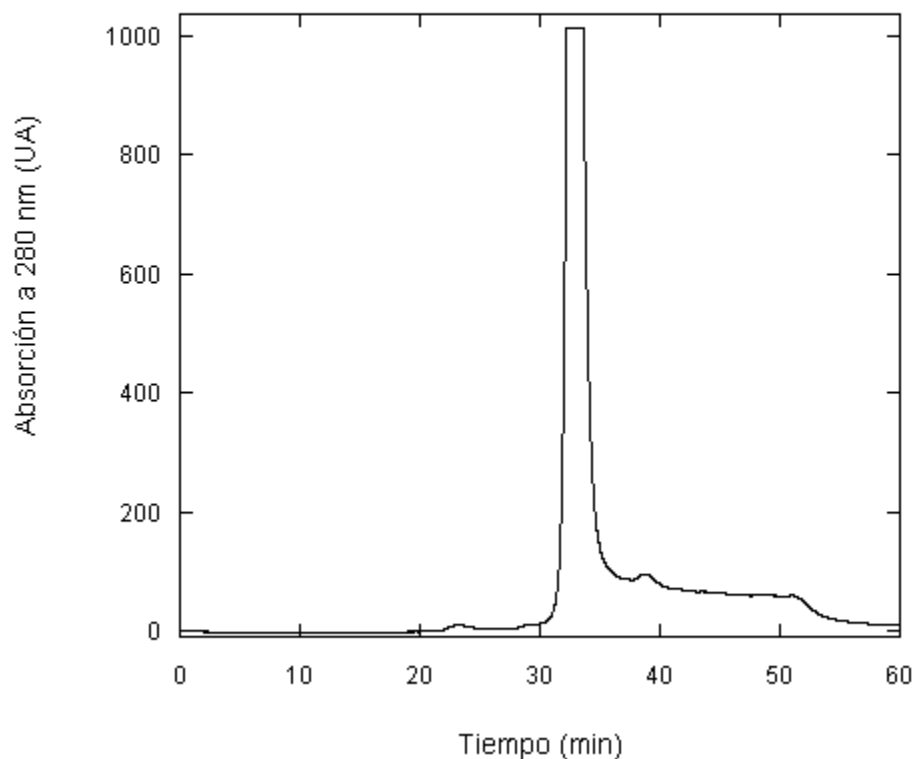


Figura 7. Cromatografía de exclusión molecular de YLSCP2.

El estado de agregación se determinó también por el método de dispersión elástica de la luz. La columna de exclusión molecular acoplada al equipo en este caso fue una Sephadex[®] G-200. A concentraciones elevadas de la muestra (490 μM), el peso molecular calculado fue de 27700, aproximadamente el esperado para el dímero (27800, Fig. 9). A menores concentraciones de muestra (200 μM), se calculó un peso molecular de 14100, consistente con el peso molecular del monómero (13900). Este experimento permite concluir que la proteína se asocia a altas concentraciones formando un dímero.

El tiempo de retención en la columna utilizada con el equipo de dispersión de luz fue independiente de la concentración de la muestra, lo que parece indicar que el comportamiento hidrodinámico del dímero no es muy diferente que el del monómero. Esto a su vez podría explicar porqué, en los experimentos de exclusión molecular descritos más arriba no se detectó asociación a las concentraciones de muestra más altas.

Cabe destacar que experimentos de SAXS [Burdgart, 2009] confirmaron la existencia de un equilibrio dímero-monómero dependiente de la concentración. Y que, como se mostrará

más adelante, se obtuvo también evidencia cristalográfica de la existencia de un estado dimérico de YLSCP2.

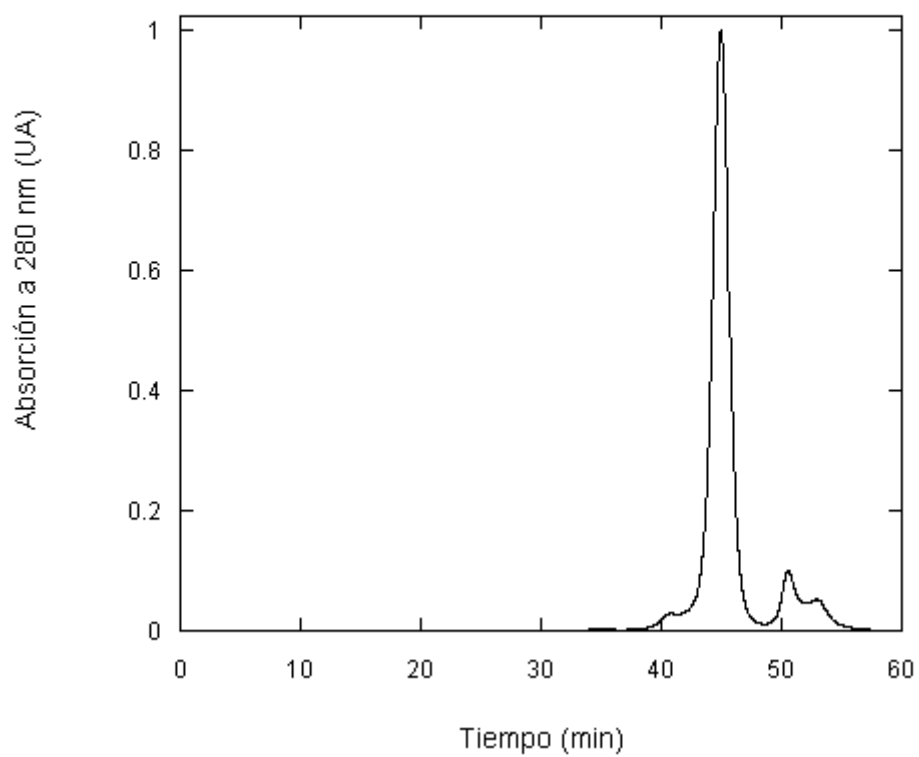


Figura 8. Exclusión molecular de YLSCP2 en el experimento de dispersión de luz. El tiempo de retención de YLSCP2 fue el mismo para las distintas concentraciones de muestra.

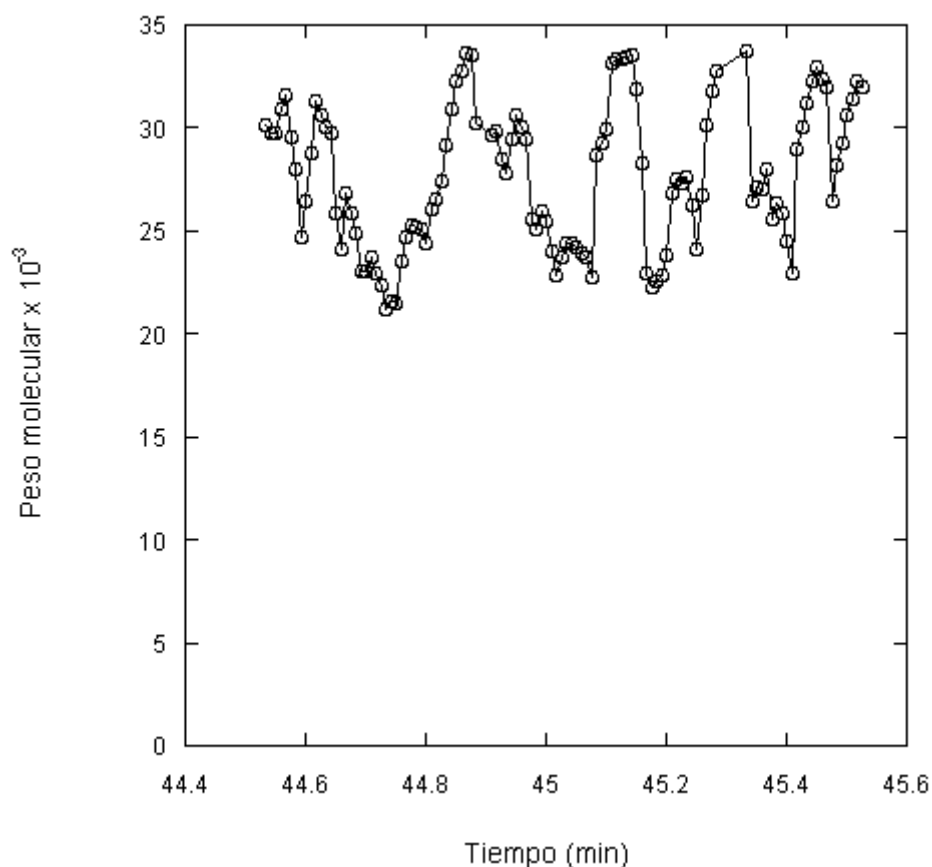


Figura 9. Peso molecular obtenido a partir de la dispersión de luz de YLSCP2. En este experimento la concentración de la muestra fue 490 μM . El peso molecular calculado en este caso es consistente con un dímero de YLSCP2. Con muestras más diluidas se obtuvieron valores consistentes con un monómero (no mostrado).

Unión de ácido parinámico

El ácido *cis*-parinámico (AP) es un ácido graso natural fluorescente de 18 carbonos con cuatro insaturaciones (C18:4 Δ 9, 11, 13, 15). El rendimiento cuántico del AP aumenta considerablemente cuando se encuentra en un ambiente apolar, pero la longitud de onda del máximo de emisión no cambia significativamente [Sklar, 1977]. La fluorescencia del AP aumenta aproximadamente seis veces con el agregado de YLSCP2, indicando que el ligando se une a la cavidad hidrofóbica de la proteína.

La unión de AP a YLSCP2 fue determinada mediante titulación seguida por fluorescencia a 410 nm, luego de excitar a una longitud de onda de 307 nm (Fig. 10). No fueron detectadas diferencias en las titulaciones realizadas utilizando soluciones del lípido en *buffer* o etanol, siempre y cuando la concentración final de etanol en la muestra fuera menor al 5% (datos no presentados). Esto sugiere que el etanol no afecta la unión del lípido al menos en bajas

concentraciones, en contraste con lo reportado para otros miembros de las SCP2 [Schroeder, 1995].

A partir del ajuste del modelo de un único sitio de unión, a los datos, fue obtenida una constante de afinidad de $0.4 \pm 0.1 \mu\text{M}$ (promedio $\pm$ DE, de 3 ensayos). Pero lo llamativo fue que el modelo ajustó solo para una ocupación parcial del sitio activo (0.5 moles de ácido parinámico por mol de proteína).

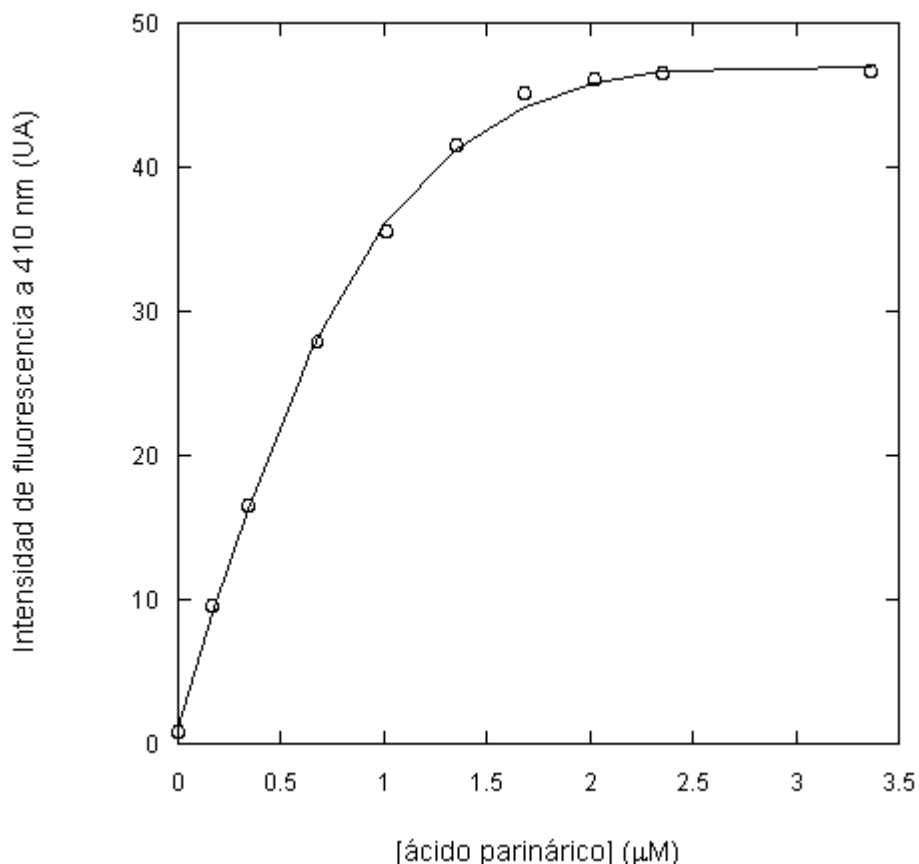


Figura 10. Experimento de unión de AP a YLSCP2 $2.5 \mu\text{M}$ seguido por emisión de fluorescencia a 410 nm y excitación a 307 nm.

El mismo experimento de titulación pero esta vez seguido por CD a 309 nm (banda de absorción correspondiente al AP), produjo resultados similares (Fig. 11).

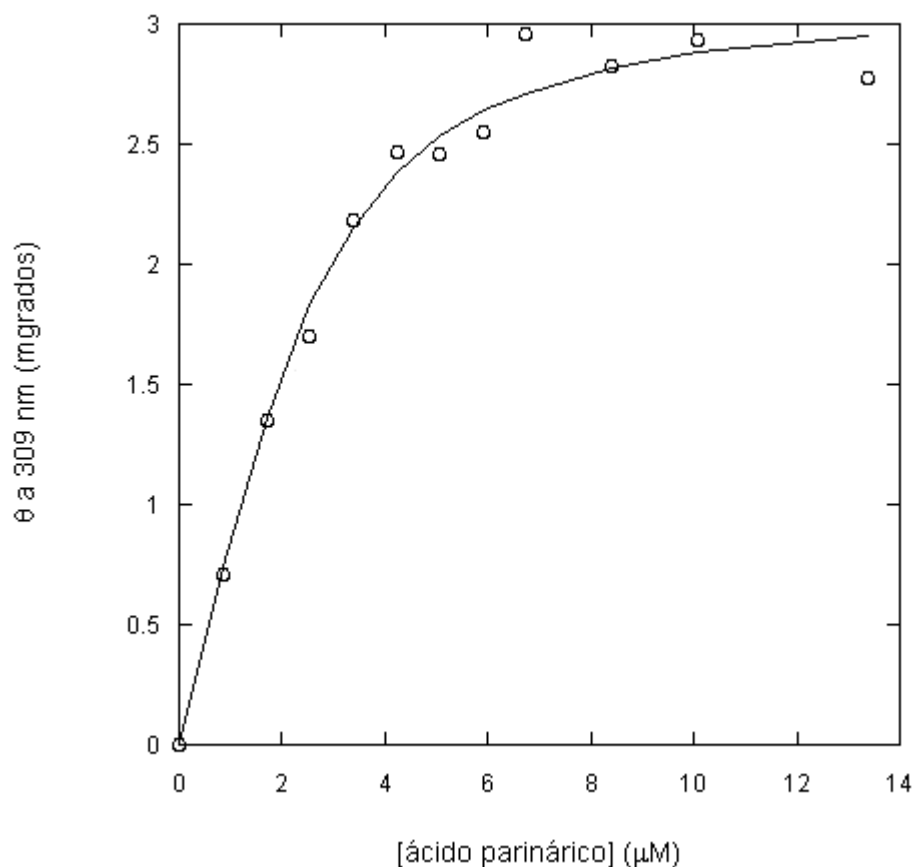


Figura 11. Experimento de unión de AP a YLSCP2 4.6 μM seguido por absorción de luz circularmente polarizada, a 309 nm.

La incompleta saturación del sitio activo podía interpretarse de distintas maneras. Sin embargo, las diferentes hipótesis fueron descartándose con distintos controles (datos no mostrados), hasta concluir que lo más probable era que el sitio de unión estuviera parcialmente ocupado por un ligando retenido en el proceso de purificación (similar AFSCP2, 3BN8). Esta hipótesis se demostró correcta (ver más abajo) y obligó a rediseñar el proceso de purificación.

Detección de ligandos endógenos

La presencia de ligandos endógenos no eliminados durante la purificación (o introducidos durante la misma) fue demostrada por cromatografía en capa delgada (Fig. 12).



Figura 12. TLC. Calle izquierda, producto de la extracción con el reactivo de Folch de YLSCP2 purificada. Calle derecha, ácido palmítico en etanol. En el extracto de la proteína pueden verse distintas bandas que corresponden a compuestos hidrofóbicos. En el control, la banda tenue por encima del ácido palmítico es presumiblemente el éter derivado del mismo.

Los resultados demostraron concluyentemente que lo que inicialmente se consideró apoproteína era en realidad un complejo proteína-ligando (este último no identificado con certeza, aunque presumiblemente un ácido graso). A pesar de que esto era una complicación en el intento de caracterizar fisicoquímicamente la interacción con ligandos, fue justamente la YLSCP2 obtenida de esta purificación la única que permitió obtener cristales adecuados para resolver la estructura cristalográfica (ver sección “Cristalización y Estructura”). Por lo anteriormente expuesto se concluyó que este primer protocolo de expresión y purificación de YLSCP2 era muy bueno en rendimiento, plegado y pureza (respecto de otras proteínas) pero no permitía obtener proteína libre de ligandos.

Con el fin de obtener apoproteína hubo que elaborar un protocolo mucho más laborioso y además identificar las fuentes del o los ligandos endógenos. El análisis de los reactivos y elementos usados en la purificación mostró que virtualmente todos ellos, a pesar de ser de la mejor calidad, estaban contaminados con trazas de ácidos grasos. Un reactivo crítico resultó ser la urea, que dependiendo del proveedor, presentaba alto grado de contaminación. En definitiva, no sólo la proteína podía traer contaminantes celulares sino que el mismo proceso de purificación introducía contaminación inaceptable.

El problema de la contaminación lipídica pudo ser resuelto eventualmente por una serie de medidas que no se discutirán aquí, pero que incluyeron la preparación en el laboratorio de urea ultrapura y el tratamiento de todos los elementos utilizados con una resina especial para extraer lípidos, Amberlite™ XAD™-16 (ver “Materiales y Métodos”).

Los resultados del protocolo de purificación de YLSCP2 libre de contaminantes lipídicos se muestran en la Fig. 13.

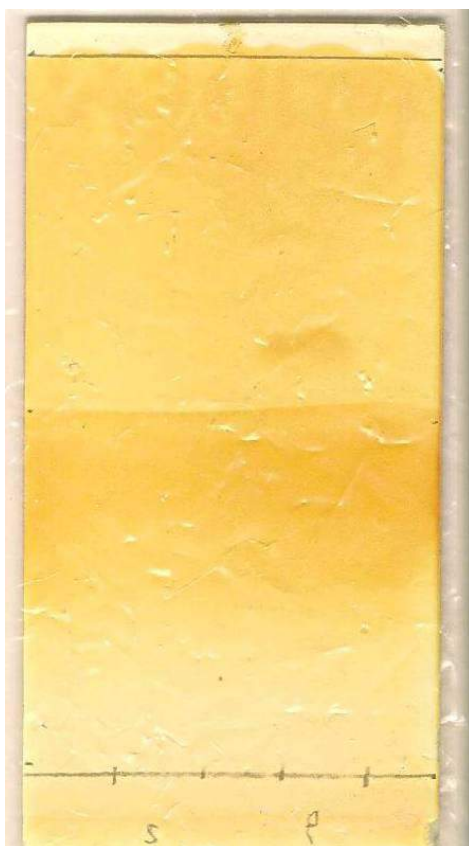


Figura 13. TLC. Calle izquierda, producto de la extracción con el reactivo de Folch de YLSCP2 purificada. Calle derecha, ácido palmítico en etanol. En el extracto de la proteína no se observan bandas contaminantes.

Con este nuevo protocolo de purificación y luego de comprobar la ausencia de contaminantes endógenos por TLC, se repitieron los experimentos de CD, SEC-FPLC, LS y unión de ácidos grasos. Los resultados se muestran a continuación.

Obtención y caracterización de YLSCP2 libre de ligandos contaminantes

El tratamiento con Amberlite™ XAD™-16 cuando se resuspenden los cuerpos de inclusión tiene un efecto positivo sobre las etapas subsiguientes de purificación. Ya en la etapa de IEC, la proteína aparece más pura y libre de contaminantes (Fig. 14).

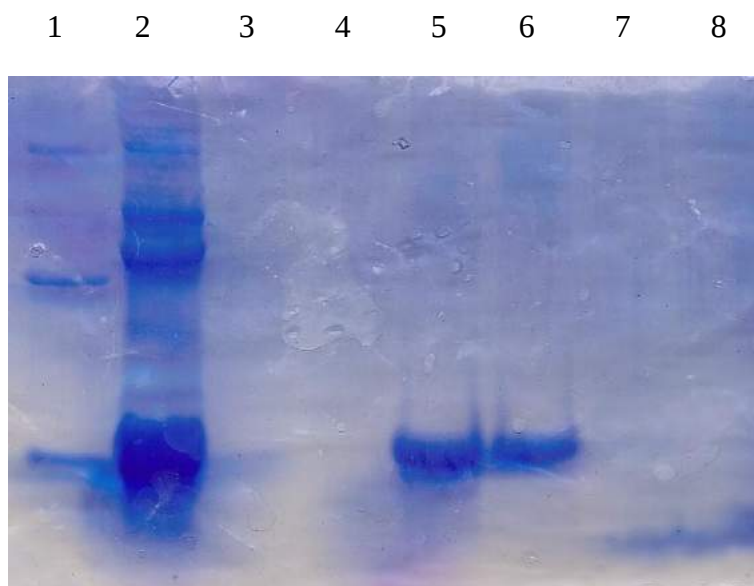


Figura 14. SDS-PAGE de las fracciones de purificación de apoYLSCP2. Calle 1, marcadores de peso molecular (66, 44, 32, 14 kDa). Calle 2, cuerpos de inclusión. Calle 3, no retenido de la IEC. Calles 4 a 8, fracciones 0, 0.25, 0.5, 0.75, 2 M NaCl, respectivamente.

El rendimiento, la pureza y resistencia a la tripsina (gel no mostrado) fueron similares a los observados utilizando el protocolo anterior (Fig. 15).

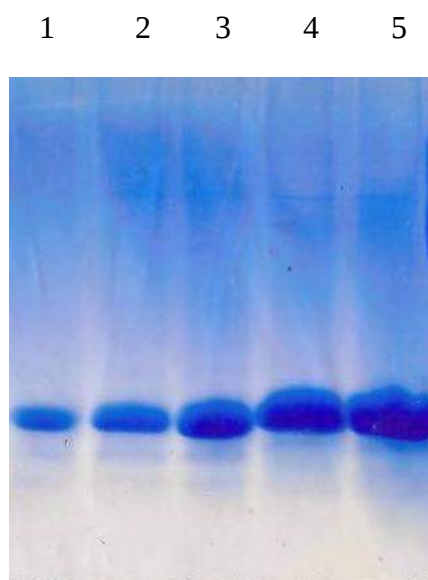


Figura 15. SDS-PAGE de apoYLSCP2. Calles 1 a 5, apoYLSCP2 4, 8, 15, 25 y 30 µg, respectivamente. La primer banda contaminante se detectó en la calle 4 (25 µg de apoYLSCP2).

Propiedades ópticas y correcto plegado

La repetición de los estudios de CD en el UV lejano y cercano, reveló un contenido algo menor de estructura secundaria y terciaria (Figs. 16 y 17).

Esta disminución leve en el contenido de estructura secundaria y terciaria podría deberse a la ausencia de ligandos adventicios que disminuyan la fluctuación conformacional de la proteína.

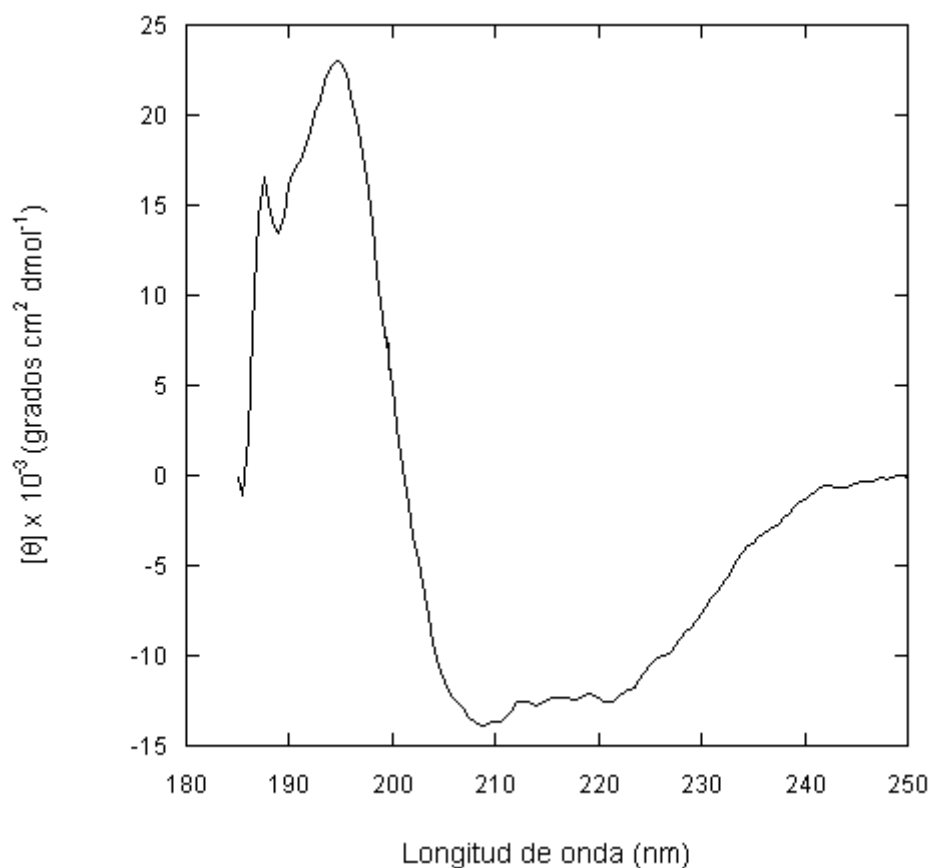


Figura 16. Espectro de dicroísmo circular de apoYLSCP2, en el UV lejano.

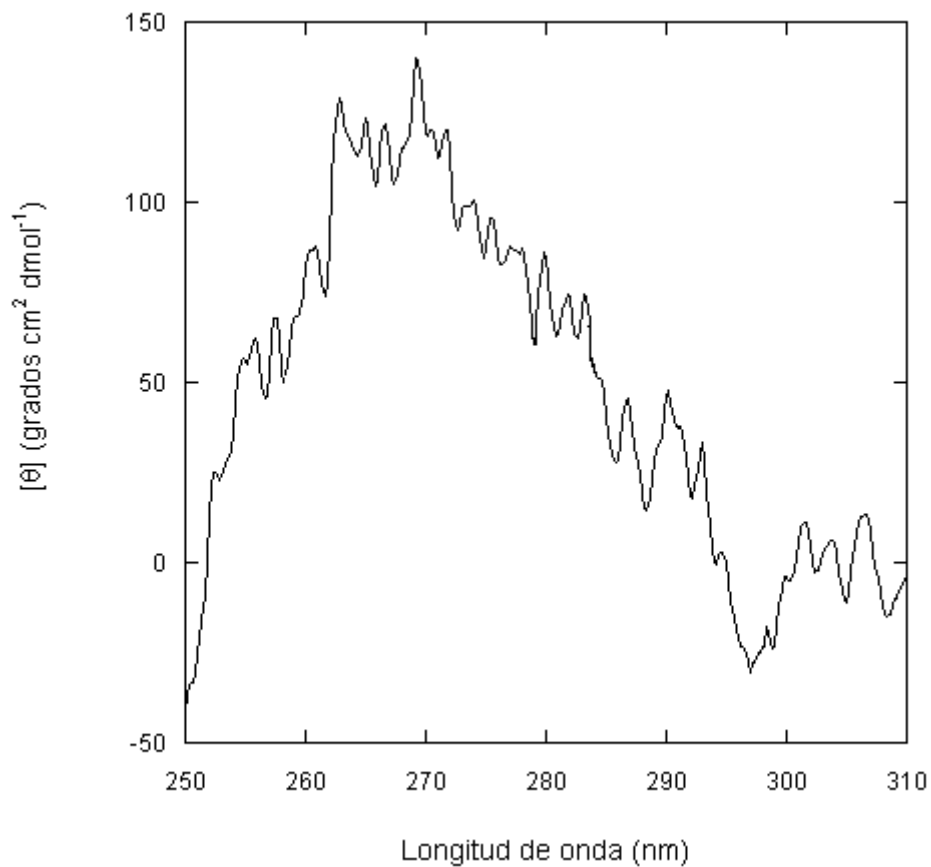


Figura 17. Espectro de dicroísmo circular de apoYLSCP2, en el UV cercano.

Espectro de absorción UV

El espectro de absorbancia de la apoYLCP2 fue el esperado para la proteína correctamente plegada (Fig.18).

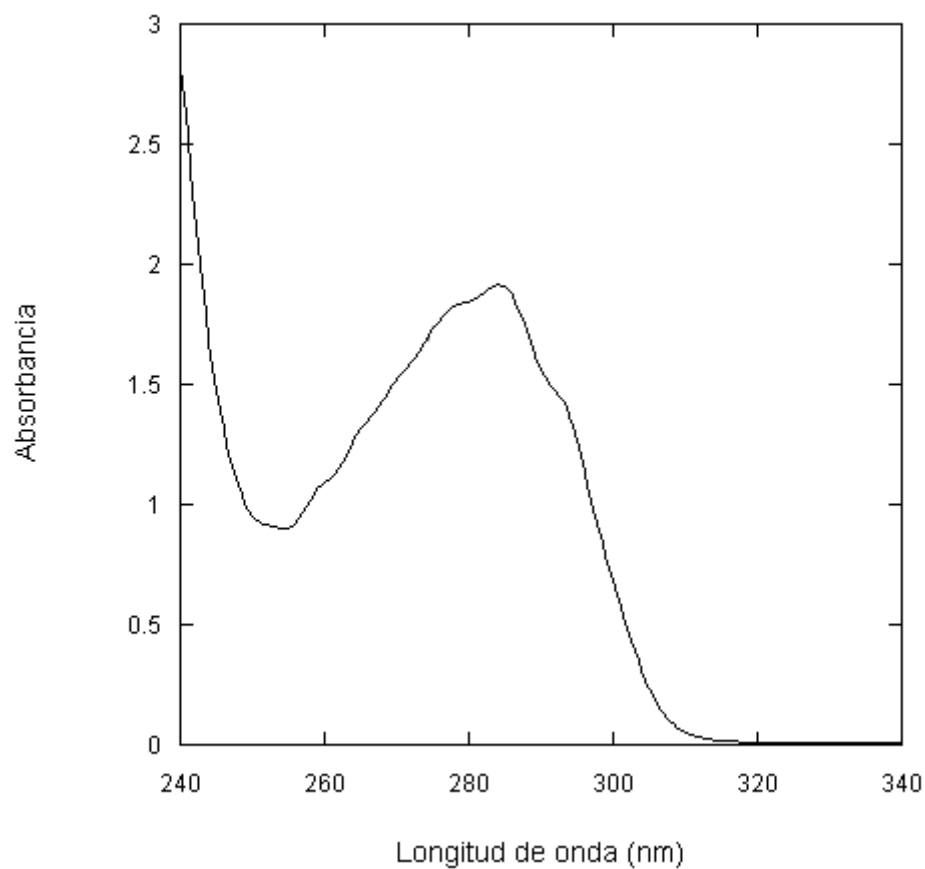


Figura 18. Espectro de absorción electrónica de apoYLSCP2. La concentración proteica fue de 3.5 mg/mL.

Estado de agregación

En los experimentos de SEC, y aunque fue corrida a concentraciones desde 2 a 500 μM , la muestra siempre eluyó como lo haría un monómero (Fig.19).

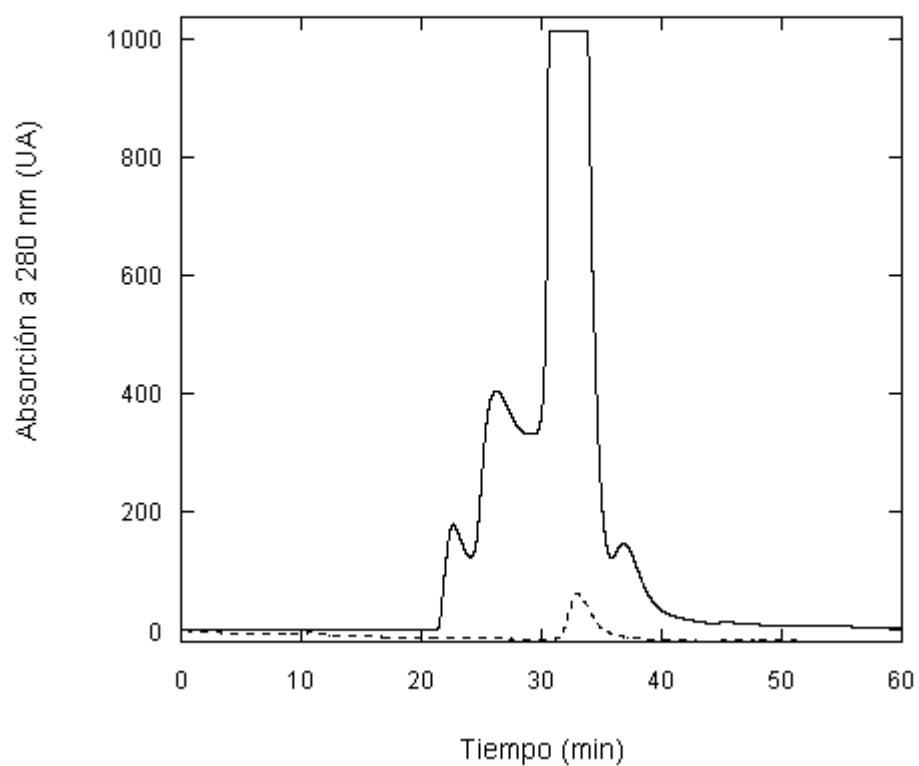


Figura 19. Cromatografía de exclusión molecular de apoYLSCP2. En línea continua, YLSCP2 250 μM y en línea de guiones, YLSCP2 2 μM .

También se realizó un nuevo experimento de dispersión elástica de la luz a una concentración de 250 μM (Fig.20). El peso molecular calculado fue de 15000, aproximadamente el esperado para el monómero (13900).

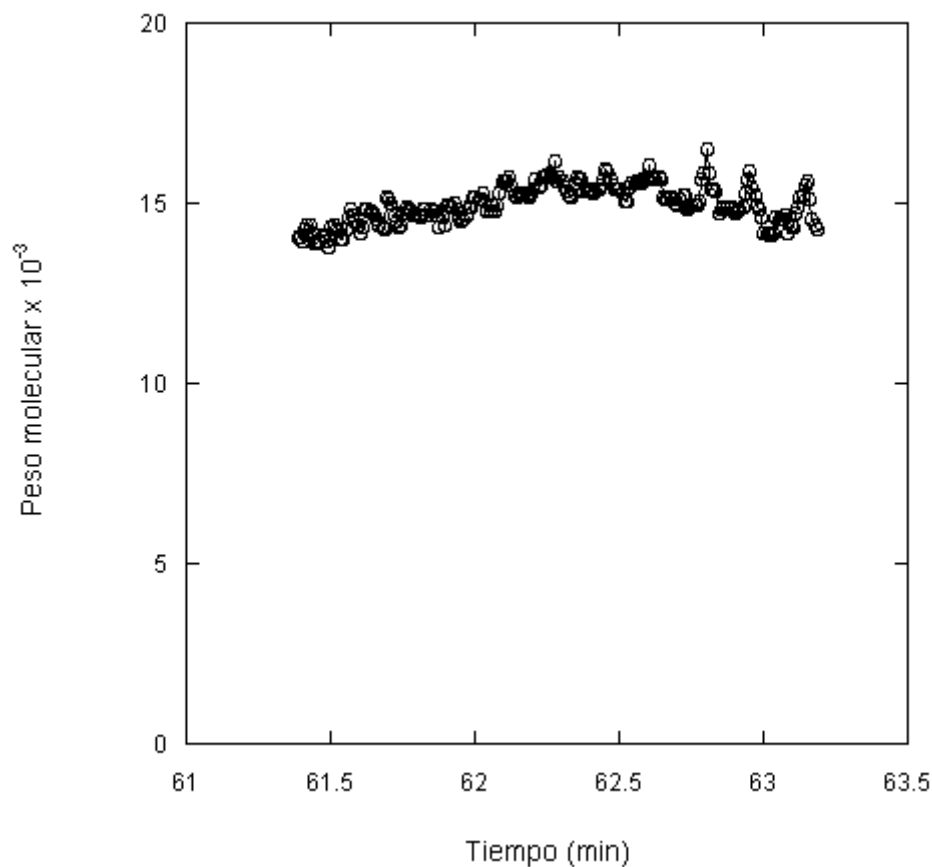


Figura 20. Peso molecular obtenido a partir de la dispersión de luz de apoYLSCP2. En este experimento la concentración de la muestra fue 250 μM . El peso molecular calculado en este caso es consistente con un monómero.

Dado que los datos obtenidos previamente con preparaciones contaminadas con ligandos adventicios sugerían la formación de un dímero a altas concentraciones, la falta del mismo en las preparaciones de apoYLSCP2 podría indicar que la constante de disociación de la misma es mayor que la de la proteína con ligandos unidos.

Unión de ácido parinámico

La unión del ácido parinámico a la apoYLSCP2 se estudió nuevamente por los mismos procedimientos indicados más arriba. En esta ocasión la K_D obtenida fue de $0.9 \mu\text{M} \pm 0.15$ y la ocupación del sitio de unión fue 0.9 ± 0.1 . Estos resultados demostraron concluyentemente la estequiometría equimolar de la unión y sentaron las bases para la utilización del ácido parinámico en ensayos de desplazamiento (ver Fig. 21 más abajo).

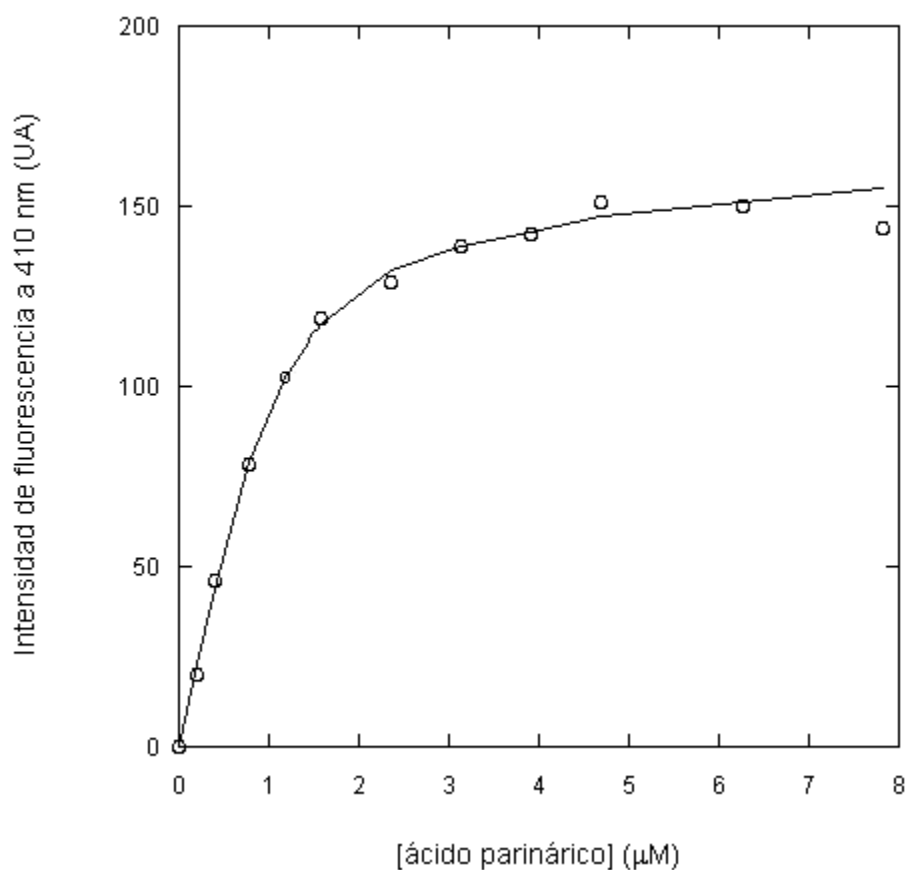


Figura 21. Experimento de unión de AP a apoYLSCP2 4 μM seguido por emisión de fluorescencia a 410 nm y excitación a 307 nm.

La fluorescencia emitida por unidad de concentración del complejo proteína-ligando se determinó en presencia de un gran exceso de proteína (30 μM), con lo que se aseguró que la emisión provenga exclusivamente del complejo 1:1 y que se incremente linealmente con la concentración del ligando (Fig. 22). Si bien el rendimiento de fluorescencia así determinado podría haberse usado como una constante en los experimentos de titulación con cantidades limitantes de proteína (ver Fig. 21), se prefirió dejarlo como parámetro libre en el ajuste global para verificar la robustez del modelo utilizado en el ajuste. El acuerdo entre las dos formas de calcular el rendimiento fue excelente (no mostrado).

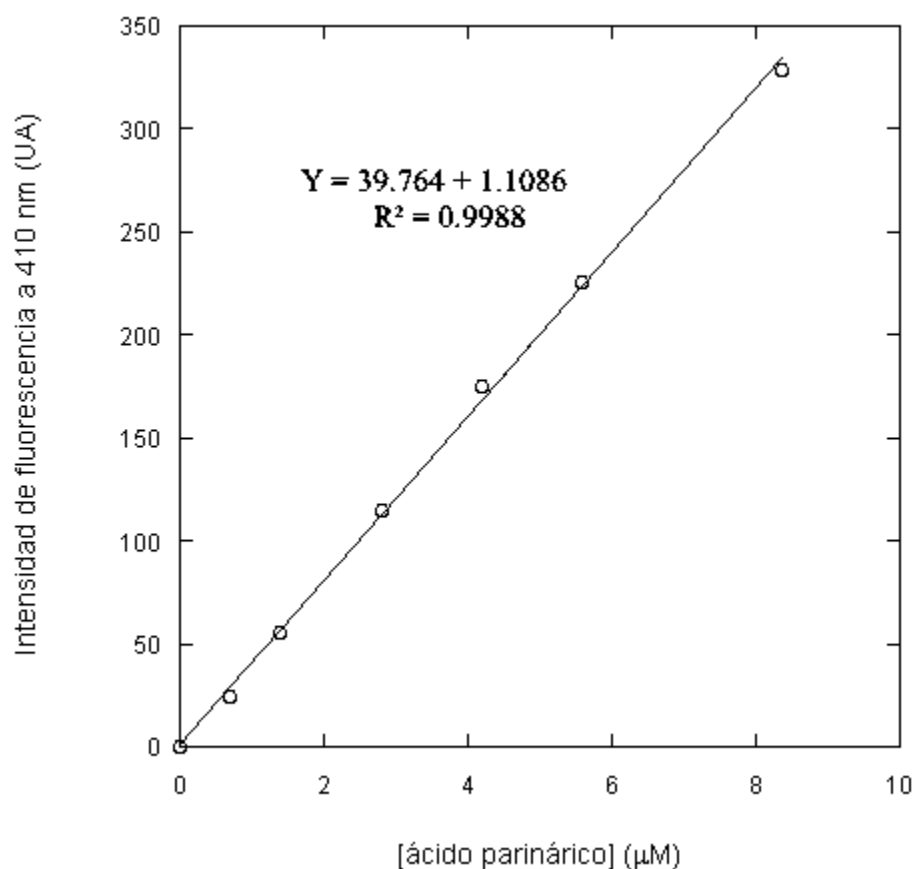


Figura 22. Fluorescencia emitida por unidad de concentración del complejo proteína-ligando.

Unión de ligandos no fluorescentes por desplazamiento de AP

Finalmente se realizaron experimentos de unión de ligandos no fluorescentes seguidos por el desplazamiento de AP (ver “Materiales y Métodos”). En estos experimentos se 'cargó' la proteína con una concentración subequimolar de ácido parinámico y se siguió la disminución de la fluorescencia ocasionada por la unión de un ligando no fluorescente (que 'desplaza' al ligando fluorescente unido). Estos experimentos son reportados frecuentemente en la literatura, pero se lo hace en forma semicuantitativa como la concentración de ligando agregado que disminuye a un 50% la emisión inicial. Nuestro interés fue encontrar modelos explícitos que permitieran determinar constantes de disociación para ambos ligandos en competencia mediante métodos de regresión no lineal. Pronto resultó evidente porque no había antecedentes de algo semejante en la literatura.

En primer lugar, las ecuaciones matemáticas de los equilibrios múltiples son mucho más complejas que las de los equilibrios simples. En segundo lugar, experimentalmente son ensayos complejos en los que hay que lidiar con los problemas que podría ocasionar la

formación de micelas por parte de ambos ligandos. La concentración micelar crítica (*CMC*) es por definición la concentración mínima a la cual un compuesto hidrofóbico comienza a formar micelas en forma espontánea en solución. Este dato fue fundamental a la hora de desarrollar los experimentos, ya que una vez alcanzada la *CMC* el ligando en estudio dejaría de desplazar al AP, y de no tener en cuenta este fenómeno los resultados serían erróneos.

Ambos problemas se abordaron aquí y se desarrollaron ecuaciones que incorporaron términos para estimar el efecto de fenómenos de agregación de los ligandos. Si bien esos términos no se deducen directamente de las ecuaciones de equilibrio, actúan como aproximaciones que permiten la convergencia de los ajustes a valores razonables para los parámetros a estimar. El tratamiento matemático de las ecuaciones se presenta en “Materiales y Métodos”. Aquí se presentarán los resultados y conclusiones de su aplicación. Los ensayos de desplazamiento por distintos ligandos se muestran en las figuras 23 a 29. Los parámetros calculados para los respectivos equilibrios se resumen en la Tabla 1.

Un primer examen de los resultados indica que las afinidades determinadas para los distintos ligandos están en acuerdo general con los múltiples datos dispersos en la literatura. Pero los ensayos realizados aquí tienen la ventaja de que fueron llevados a cabo en forma comparativa y por un mismo método. Además, se pudo determinar directamente las afinidades y no solamente la dosis que provoca el 50% del desplazamiento. Es más, respecto a esto último, está implícito en estos resultados que el cálculo de la dosis 50% es una aproximación muy pobre a la afinidad relativa de los distintos ligandos entre sí y con el AP.

Para el ácido palmítico se obtuvo una $K_D=0.5 \mu\text{M} \pm 0.1$. La *CMC* aparente estimada por el ajuste fue $5.5 \mu\text{M} \pm 1$ lo que está en perfecta concordancia con las *CMCs* reportadas en la literatura (Fig. 23). Para el ácido oleico se obtuvo una $K_D=0.9 \mu\text{M} \pm 0.15$. La *CMC* aparente estimada por el ajuste fue $6.4 \mu\text{M} \pm 0.4$ la cual también está en perfecta concordancia con las *CMCs* reportadas en la literatura (Fig. 24). Para el ácido esteárico el cálculo de la K_D fue complicado porque se observó sólo un 20% de desplazamiento de la señal. Sin embargo, la *CMC* aparente estimada por el ajuste fue $1.8 \mu\text{M} \pm 0.02$, lo que está en perfecta concordancia con las *CMCs* reportadas en la literatura y el valor de K_D fue igual a $0.55 \mu\text{M} \pm 0.05$, un valor perfectamente compatible con otros datos de la literatura (Fig. 25).

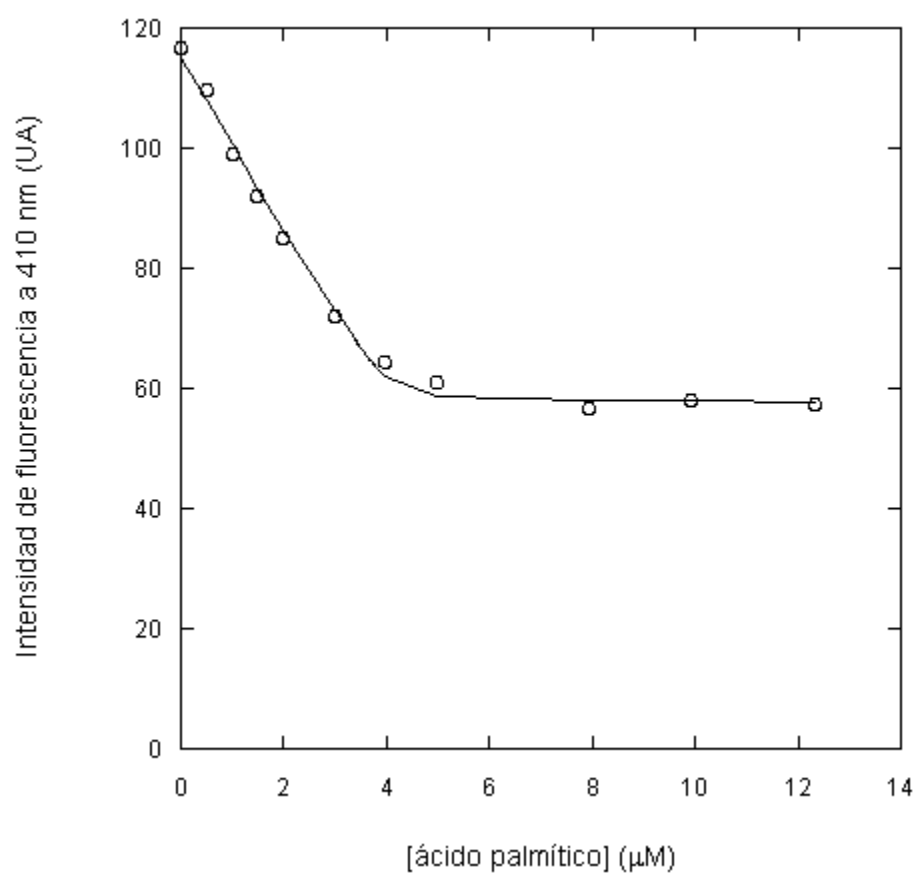


Figura 23. Experimento de desplazamiento de AP (4.3 μM) en complejo con YLSCP2 (4.3 μM) por ácido palmítico, seguido por fluorescencia a 410 nm.

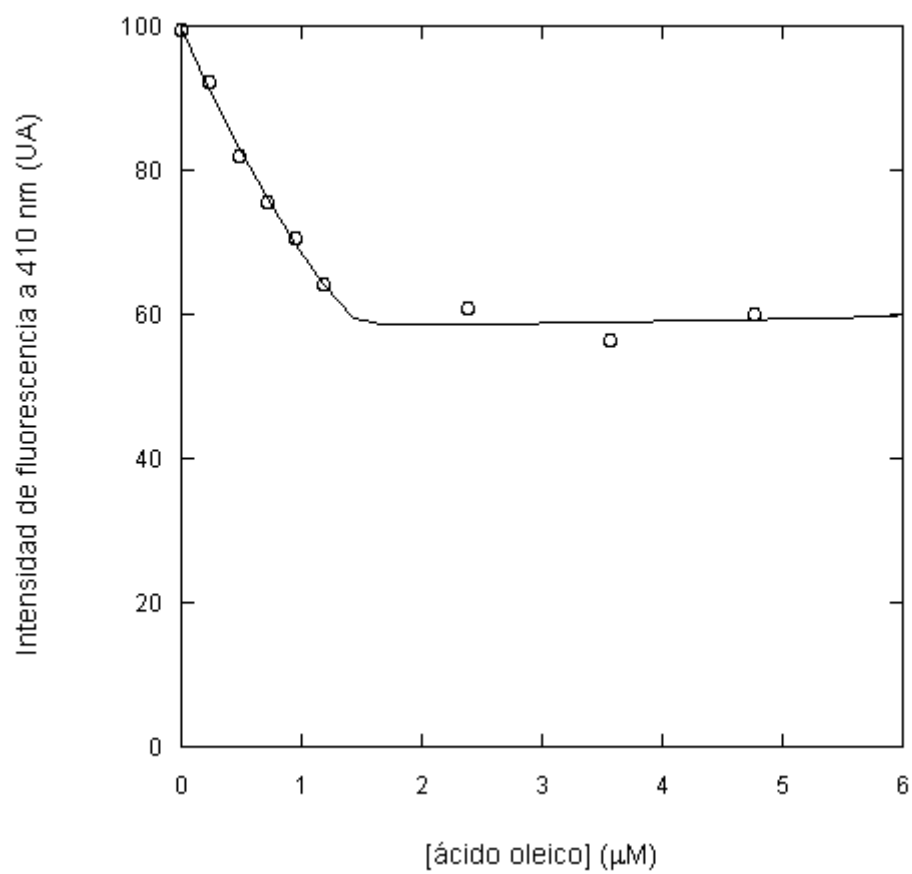


Figura 24. Experimento de desplazamiento de AP (4.2 μM) en complejo con YLSCP2 (4.2 μM) por ácido oleico, seguido por fluorescencia a 410 nm.

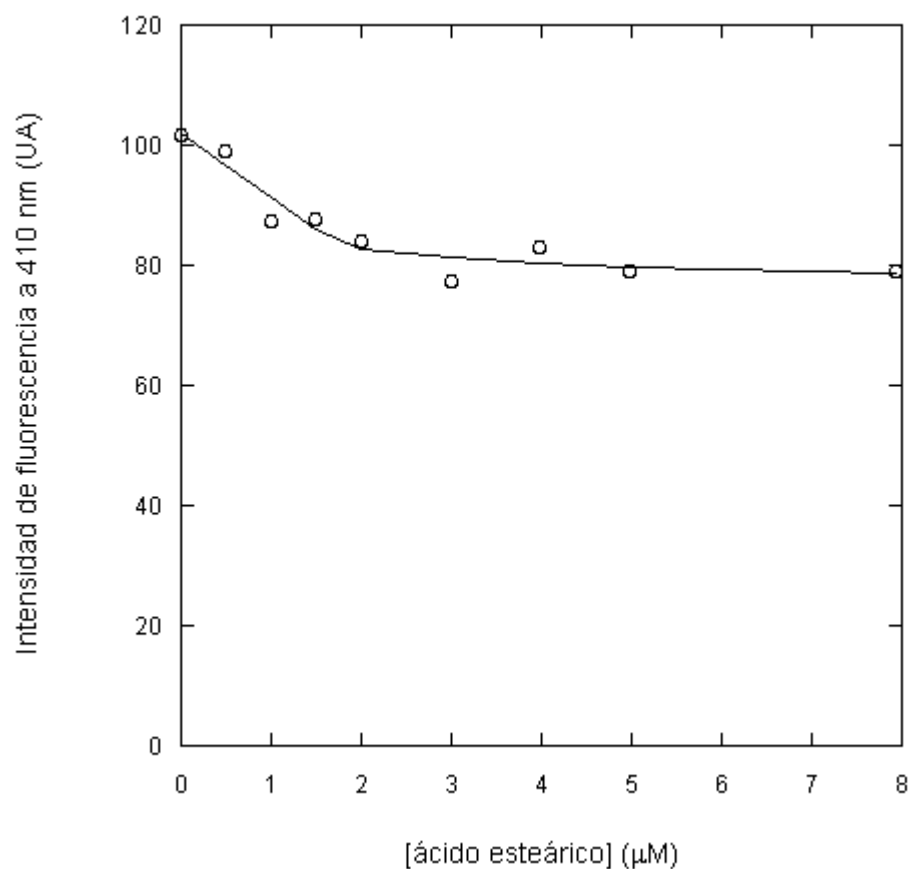


Figura 25. Experimento de desplazamiento de AP ($4.3 \mu\text{M}$) en complejo con YLSCP2 ($4.3 \mu\text{M}$) por ácido esteárico, seguido por fluorescencia a 410 nm.

Los acil derivados de la CoA tienen *CMCs* mucho más elevadas que sus respectivos ácidos grasos, por lo que alcanzaron a desplazar por completo al AP.

Para el palmitoil-CoA se obtuvo una $K_D = 0.09 \mu\text{M} \pm 0.03$. Para el oleil-CoA una $K_D = 0.025 \mu\text{M} \pm 0.003$. Para el estearoil-CoA se obtuvo una $K_D = 0.08 \mu\text{M} \pm 0.005$. Y para el SDS se obtuvo una $K_D = 0.9 \mu\text{M} \pm 0.05$.

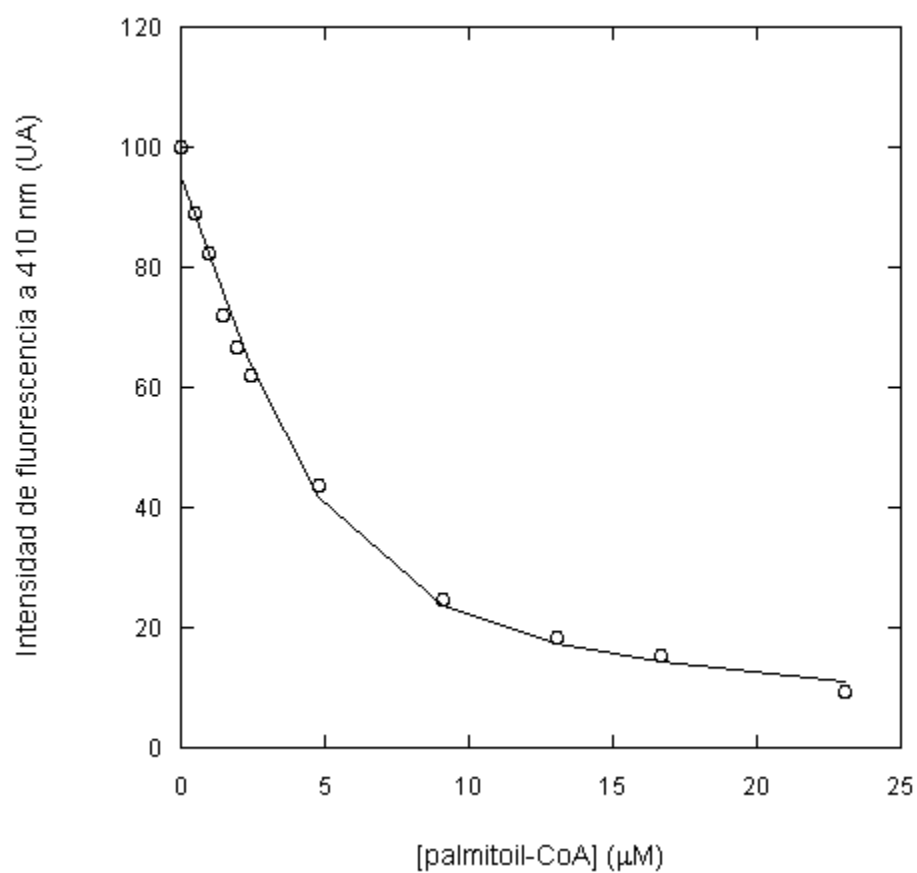


Figura 26. Experimento de desplazamiento de AP (4.2 μM) en complejo con YLSCP2 (4.2 μM) por palmitoil-CoA, seguido por fluorescencia a 410 nm.

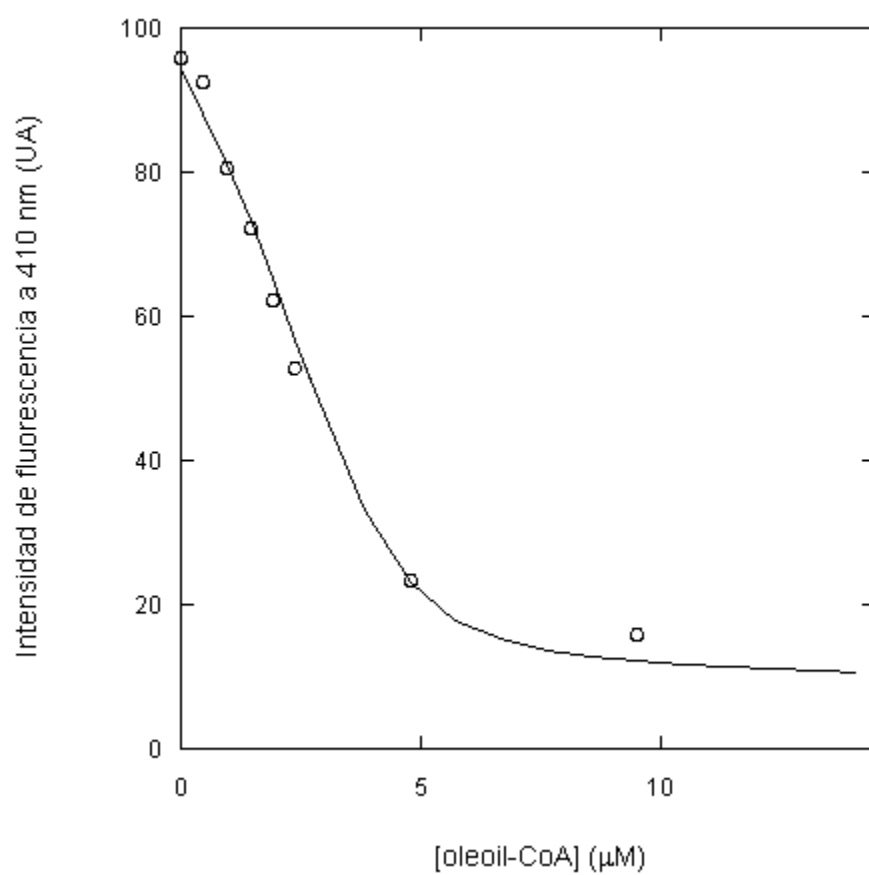


Figura 27. Experimento de desplazamiento de AP (4.3 μM) en complejo con YLSCP2 (4.3 μM) por oleoil-CoA, seguido por fluorescencia a 410 nm.

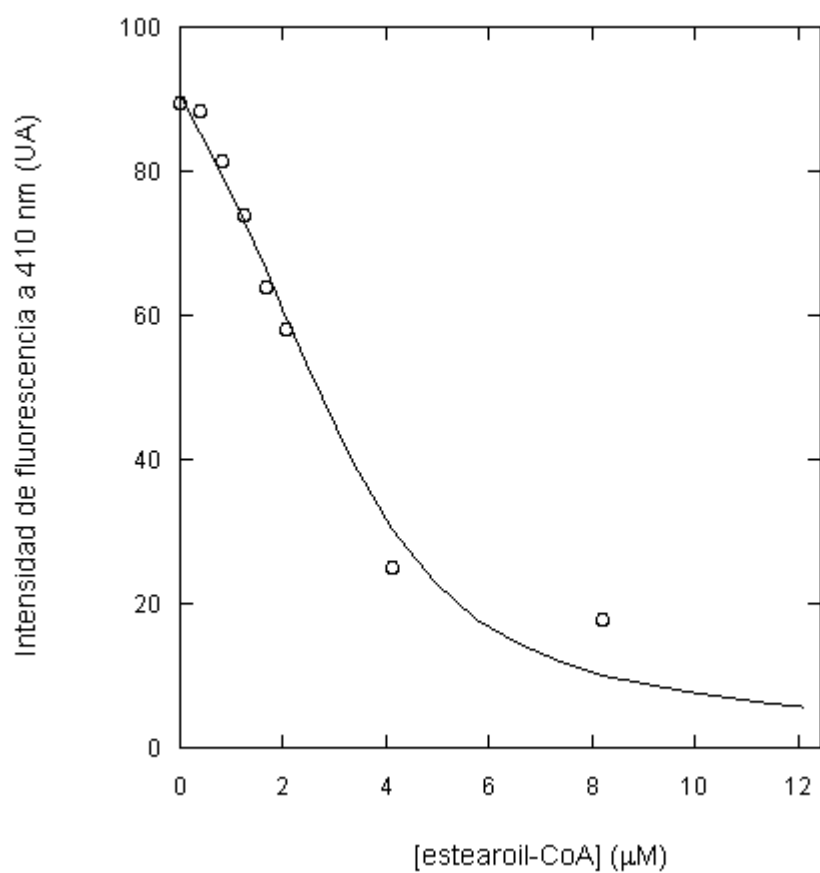


Figura 28. Experimento de desplazamiento de AP (4.3 μM) en complejo con YLSCP2 (4.3 μM) por estearoil-CoA, seguido por fluorescencia a 410 nm.

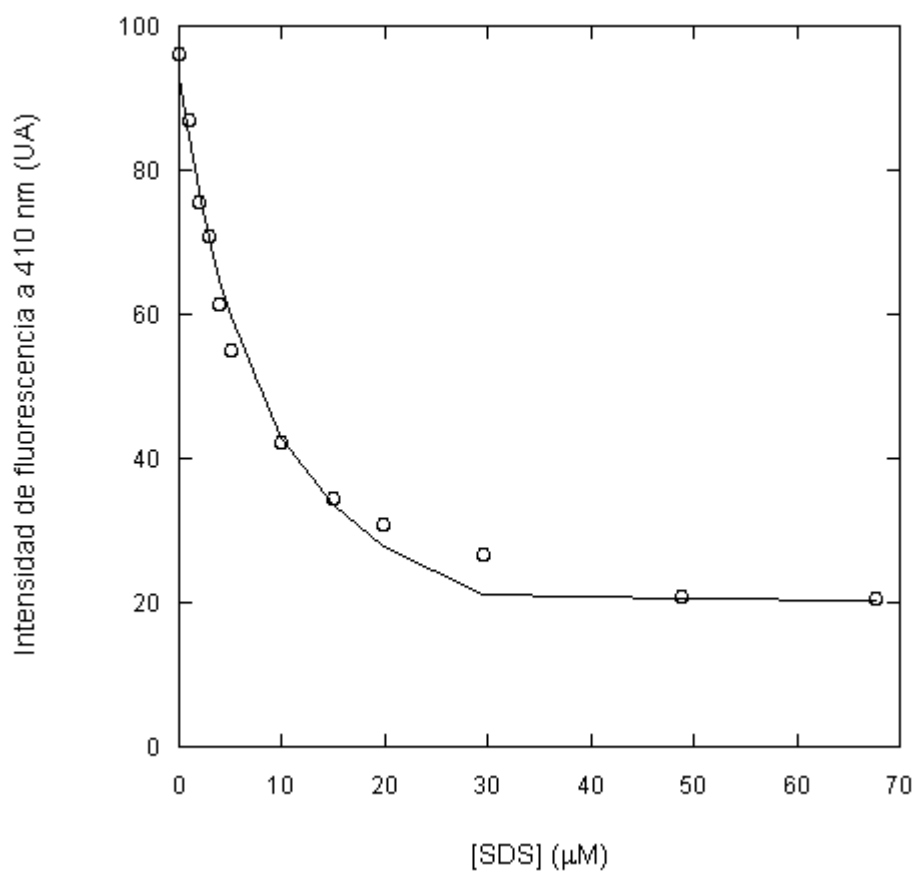


Figura 29. Experimento de desplazamiento de AP (4.3 μM) en complejo con YLSCP2 (4.3 μM) por SDS, seguido por fluorescencia a 410 nm.

Se utilizaron también DPG y colesterol como ligandos desplazantes, pero no se observó desplazamiento en las condiciones ensayadas. Muy probablemente debido a que sus *CMCs* son muy pequeñas y no porque YLSCP2 no sea capaz de unirlos.

Ligando	K_D (μM)
Ác. parinárico	0.9 ± 0.1
Ác. palmítico	0.5 ± 0.1
Ác. oleico	0.9 ± 0.15
Ác. esteárico	0.55 ± 0.05
Palmitoil-CoA	0.09 ± 0.03
Oleil-CoA	0.025 ± 0.003

Estearoil-CoA	0.08 ± 0.005
SDS	0.9 ± 0.05

Tabla 1. Constantes de disociación para cada ligando desplazante obtenidas mediante el ajuste descrito en el texto (ver “Materiales y Métodos”).

Cristalización y Estructura

Como ya se había mencionado los cristales que finalmente difractaron con mayor resolución y que permitieron resolver la estructura cristalográfica fueron los de la YLSCP2 proveniente de la purificación no libre de ligandos endógenos. Dos condiciones resultaron óptimas (Figs. 30 y 31).

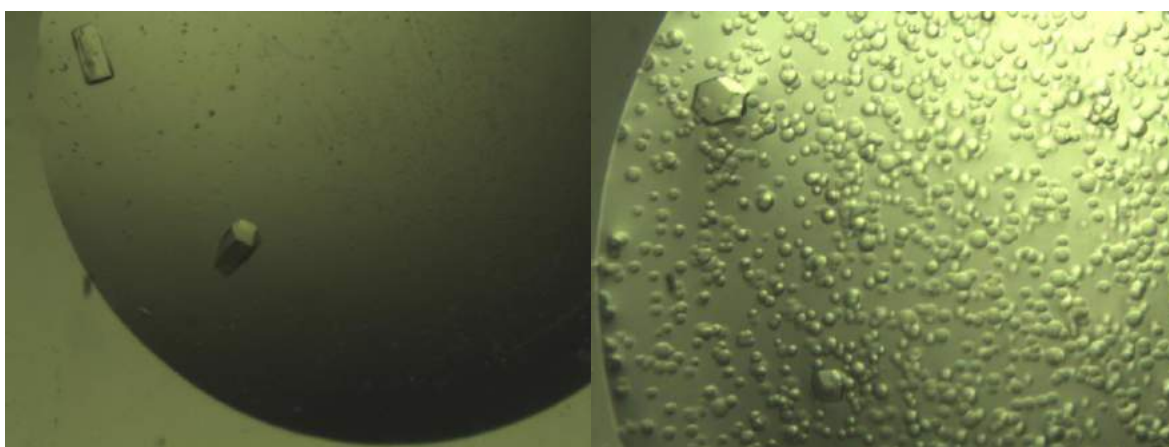


Figura 30. Cristales de YLSCP2 con ácido palmítico en la condición 1 (HEPES Na 0.1 M, pH 7.0, citrato tribásico de sodio 1.4 M, pH 6.5; crioprotector PEG 400 10% v/v).

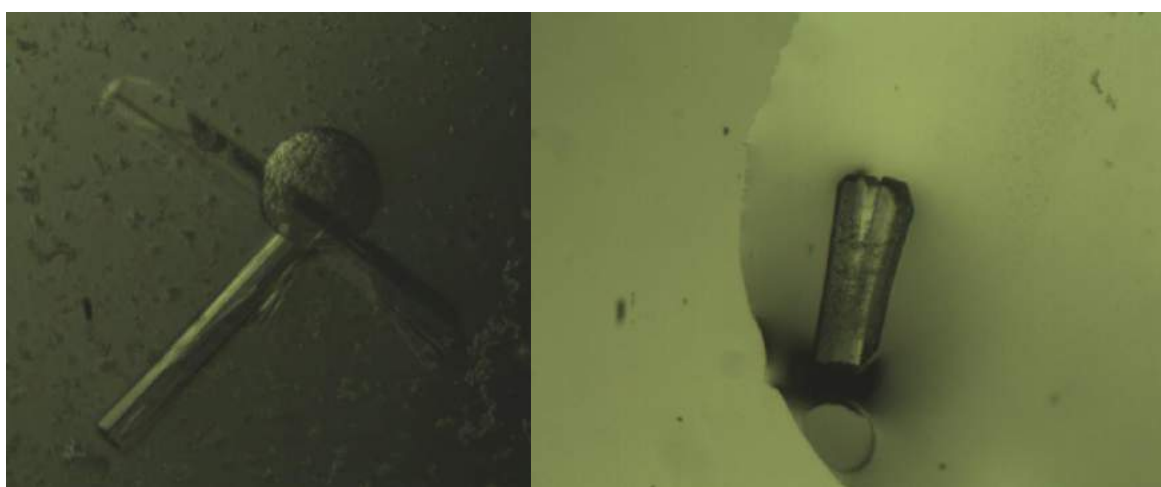


Figura 31. Cristales de YLSCP2 con ácido palmítico en la condición 2 (tartrato de sodio y potasio tetra-hidratado 0.2 M, citrato tribásico de sodio di-hidratado 0.1 M, pH 5.6, sulfato de amonio 2 M; crioprotector sulfato de amonio 3.4 M).

Aunque el cristal crecido en la condición 1 produjo los datos de mayor resolución (~ 2 Å), en ambas condiciones se llegó esencialmente a la misma estructura. En lo que sigue se describe en detalle la estructura resuelta con los cristales obtenidos en la condición 1.

El grupo espacial fue $P3_121$ y la unidad asimétrica contiene un homodímero (Fig. 32). Cada monómero es una esfera de $40 \times 30 \times 30$ Å. También pudieron observarse 75 moléculas de agua y dos moléculas de citrato.

Los datos, de muy buena calidad, permitieron resolver una cadena por completo (cadena B), y de la segunda cadena, 119 de los 128 residuos aminoacídicos (cadena A). La resolución final fue de 2.2 Å y el $R_{free}=0.22$. La estadística de los datos cristalográficos y del refinado de la estructura se muestra en la Tabla 2.

La relevancia biológica del homodímero observado en la celda unitaria fue analizada mediante el programa PISA [Krissinel & Henrick, 2007], métodos estándar del *Protein Data Bank*. El índice obtenido por este programa fue 0.8 y se considera que por encima de 0.5 es altamente probable que sea un dímero relevante en solución. La superficie de interacción fue de $\sim 10\%$ (704 Å^2) con una energía libre de disociación estimada de $1.4 \text{ kcal mol}^{-1}$.

Ambos monómeros poseen casi idéntica estructura, y muy similarmente posicionada la molécula de palmitato. El *RMSD* entre ambos medido por la cadena principal es de 0.62 Å, y esta diferencia se debe en gran medida a la hélice α C-terminal (hélice $\alpha 5$). El monómero A tiene dicha hélice desplazada una vuelta de hélice, en comparación a la misma hélice en el monómero B. Esto es importante ya que permite, a su vez, que la molécula de palmitato A también esté levemente desplazado y acomode su cadena alifática paralelamente a la cadena lateral de la metionina B 112. La metionina B 112 se 'introduce' en la cadena A participando en la interface de dimerización, fenómeno que podría o no ser dependiente de la presencia de ligandos (Figs. 32 y 33).

El homodímero hallado en la celda unitaria es muy inusual y merece una consideración especial. La casi totalidad de los dímeros reportados en el PDB tienen simetría C2. Esto implica que ambos monómeros se enfrentan utilizando la misma superficie. El dímero observado para YLSCP2 no es un dímero tradicional ya que carece de la típica simetría C2 (el patrón de los residuos que interaccionan es diferente en cada subunidad). A pesar de que este hecho permite la formación de cadenas abiertas (es decir de crecimiento continuo), no es el caso de YLSCP2 ya que las diferencias conformacionales mencionadas entre las

cadena A y B (desplazamiento de la hélice $\alpha 5$) resultan en la formación de una única superficie de interacción estable por homodímero.

YLSCP2 posee un plegado tipo $\alpha + \beta$ [Murzin, 1995]. Su estructura consiste en una lámina β compuesta de cinco cordones β , ‘cubierta’ por cinco hélices α . La lámina β tiene sus cordones ordenados del siguiente modo: 3-2-1-4-5, todos antiparalelos excepto el 1 y 4. Las hélices α y la cara interna de la lámina β forman una gran cavidad en donde se ubica el ligando.

Respecto del sitio de unión, fue hallada una molécula de palmitato por monómero (Fig. 32). La cavidad posee forma de *T* y dimensiones de $19 \times 18 \times 10 \text{ \AA}$, su volumen es de $796 \text{ \AA}^3$. La lámina β actúa de ‘piso’ y por ‘encima’ las hélices α N y C-terminal, junto con el motivo hélice-loop-hélice que conecta los cordones $\beta 4$ y $\beta 5$, terminan de formar la cavidad.

Algo característico es el hecho de que el sitio de unión está formado casi exclusivamente por átomos de carbono que forman interacciones de *van der Waals* con el ligando. No se identificaron interacciones polares o moléculas de agua ordenadas en el sitio. Los átomos de oxígeno del ligando están parcialmente enterrados en el fondo de un bolsillo abierto y presumiblemente interactúen con moléculas de agua. Sin embargo no hay evidencia convincente de interacciones iónicas o puentes de hidrógeno con el solvente o con otros átomos de la proteína (Figs. 34 y 35).

La cavidad está sólo parcialmente ocupada por el ácido graso de 16 carbonos y podría albergar ligandos más largos y/o anchos. Para ilustrar esto, se modeló una molécula de ácido fitánico en el sitio de unión en la misma posición y orientación que la de ácido palmítico (Fig. 36). El ajuste pudo realizarse sin ningún choque estérico a pesar de los cuatro grupos metilo adicionales del ácido fitánico. También fue posible acomodar una molécula de palmitoil-CoA, y lo interesante fue que los grupos fosfato de la coenzima A pueden ser localizados aproximadamente en la misma posición que la de una de las moléculas de citrato observadas en la difracción (Fig. 37).

Respecto del potencial electroestático, YLSCP2 es una proteína fuertemente básica. El pI calculado usando PROPKA 3.0 [Li, 2007] para la estructura plegada es 9.9. Esto es consecuencia del alto contenido de residuos básicos ya que el pI calculado para la estructura desplegada es básicamente el mismo. El potencial electroestático en la superficie de la proteína calculado usando APBS [Baker, 2001] se muestra en la figura 38. El cálculo evidencia que YLSCP2 posee una gran e inusual superficie fuertemente positiva. La naturaleza básica y la asimetría en la distribución de cargas positivas también fueron observadas en SCP2 de humano y conejo, y en MFE2SCP2 (no mostrado). Es interesante que ambas características están ausentes en las SCP2 de mosquito, bacteria y arquea, las cuales son todas proteínas ácidas.

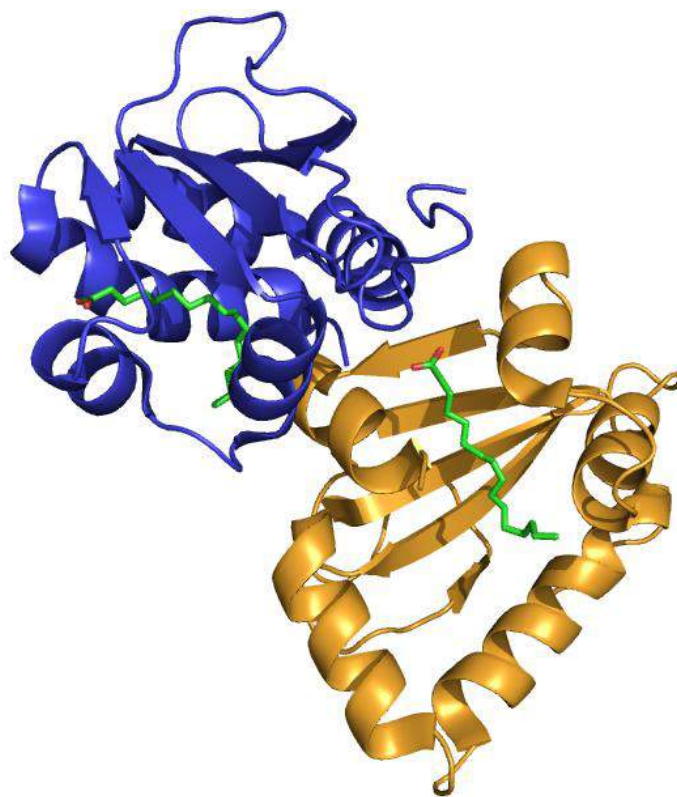


Figura 32. Dímero cristalográfico de YLSCP2. En naranja el monómero A. En azul el monómero B. En verde las moléculas de ácido palmítico con sus oxígenos en rojo.

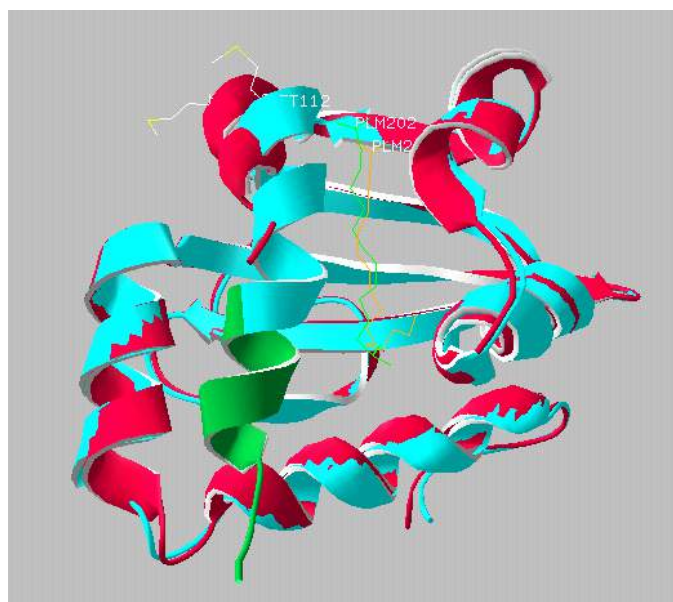


Figura 33. Superposición de ambos monómeros de YLSCP2 (A en magenta y B en turquesa cian). En verde oscuro se muestra la porción de hélice α que solo se resolvió en el monómero B. La molécula de ácido palmítico A en verde claro y la de ácido palmítico B en naranja. Puede verse que diferente quedan ubicadas las Mets 112.

Colección de datos^a	
Longitud de onda (Å)	0.9795
Grupo espacial	P3 ₁ 21
Parámetros de celda unitaria (Å)	
a = b	67.35
c	117.02
Resolución (Å)	30.0–2.20 (2.32–2.20) ^b
Reflexiones únicas	16,186 (586)
R^c_{merge}	0.068 (0.453)
$\langle I \rangle / \langle \sigma \rangle$	23.1 (5.4)
Compleitud (%)	99.9 (100.0)
Redundancia	10.0 (9.8)
Factor B Wilson (Å ²)	35.2
Coeficiente de Matthews (Å ³ /Da)	2.73
Fracción de solvente (%)	54.9
Copias/ASU	2
Refinamiento	
Resolución (Å)	29.19–2.20
Reflexiones	15,538
R^d_{work}	0.187
R^e_{free}	0.217
Átomos de proteína	1,883
Átomos de ligando	62
Moléculas de agua	75
Geometría	
Factor B isotrópico promedio (Å ²)	
Átomos totales de proteína	40.7
Átomos de cadena principal	39.5
Átomos de ácido palmítico	68.8
Átomos de agua	41.7
Enlace RMSD	
Longitudes (Å)	0.008
Ángulos (°)	1.277
Gráfico de Ramachandran ^f (%)	
Favorecidos	91.7
Permitidos ‘adicionales’	7.8
Permitidos ‘generosos’	0.5
Aberrantes	0.0
Deposición RCSB	
Código en el PDB	4JGX

Tabla 2. Estadística de los datos cristalográficos y del refinado de la estructura 3D de YLSCP2.

^a Los datos fueron colectados de un único cristal

^b Los valores entre paréntesis son para los valores más elevados de resolución

^c $R_{merge} = \sum_{hkl} \sum_i |I_{hkl,i} - \langle I_{hkl} \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_{hkl,i}$

^d $R_{work} = \sum |F_{obs} - F_{calc}| / \sum |F_{obs}|$, donde F_{calc} y F_{obs} son las amplitudes de los factores de estructura calculados y observados, respectivamente

^e R_{free} es el mismo que R_{work} , pero calculado para el 5.0% del total de las reflexiones (elegidas al azar y omitidas durante el refinamiento)

^f Correspondiente a un residuo único, Asn 60, en ambas cadenas y definido como en PROCHECK

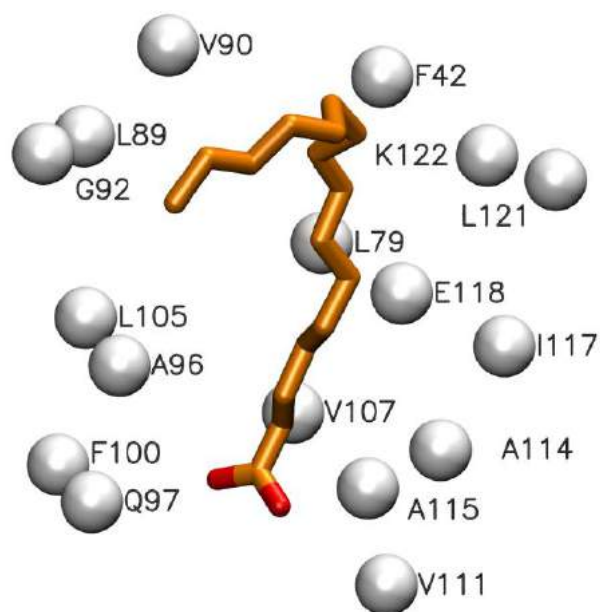


Figura 34. Contactos en el sitio de unión de YLSCP2, monómero B. Son nombrados los residuos que establecen uno o más contactos de *van der Waals* con la molécula de palmitato. Solo está representado el carbono α de cada residuo. Se hallaron sólo contactos proteína-ligando no polares.

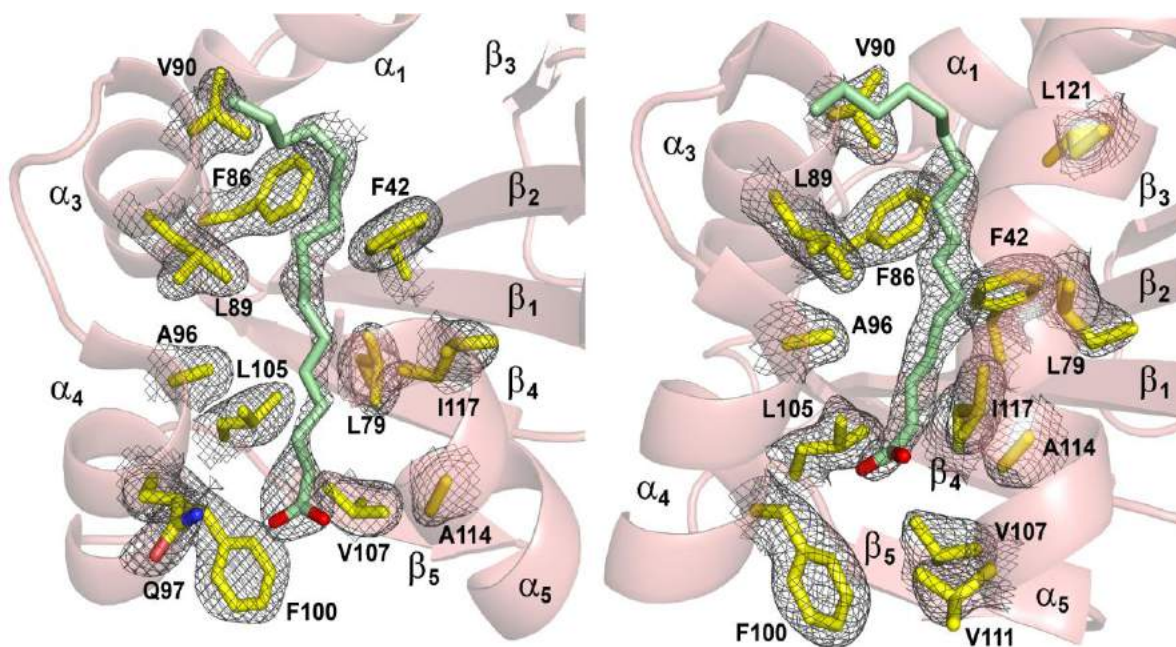


Figura 35. Mapa de densidad electrónica del sitio de unión, incluyendo, palmitato y cadenas laterales cercanas. Las cadenas A y B son mostradas en los paneles izquierdo y derecho respectivamente.

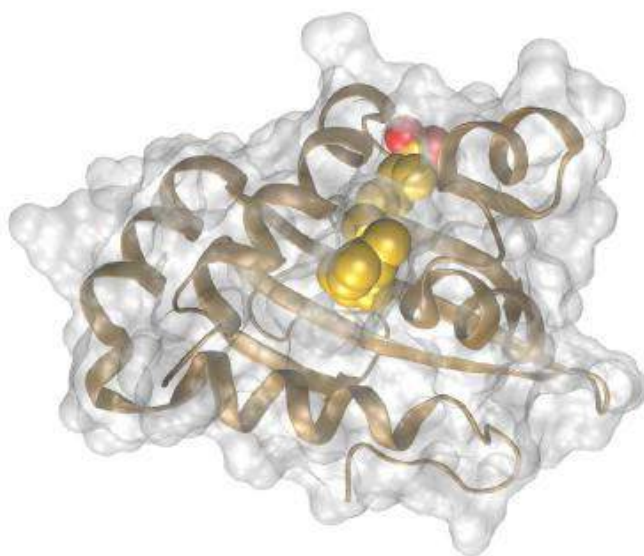


Figura 36. Modelo propuesto para la unión de ácido fitánico a YLSCP2. La molécula de ácido fitánico en la conformación reportada en el código 2WM4 del RCSB PDB fue superpuesta a la molécula de palmitato en complejo con YLSCP2 reportado en este trabajo. Solo los primeros seis átomos comunes de la cabeza polar fueron superpuestos. La estructura resultante para toda la molécula de ácido fitánico, que reemplaza a la de palmitato, se muestra en la figura. No fueron necesarios más ajustes en la conformación de la proteína o del ligando para proveer una ocupación correcta del sitio de unión, y libre de choques estéricos.

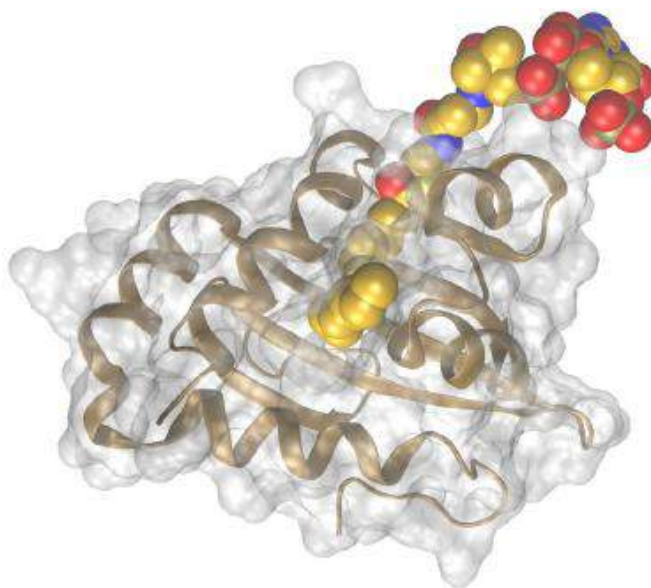


Figura 37. Modelo propuesto para la unión de palmitoil-CoA a YLSCP2. El ácido graso fue posicionado como se describió en la figura anterior (Fig. 36). El solvente expuesto a la CoA fue manualmente modelado para colocar los grupos fosfatos en aproximadamente el mismo lugar en el que uno de los aniones citrato se une a YLSCP2 (no mostrado).

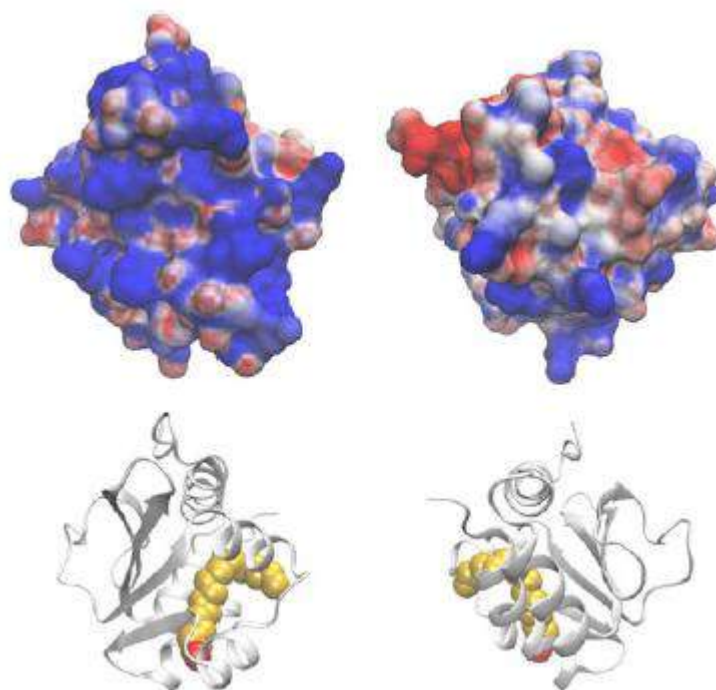


Figura 38. Superficie fuertemente básica de YLSCP2. Arriba, dos caras opuestas (una rotación de 180° respecto de un eje vertical en el plano de la hoja) de YLSCP2 coloreadas acorde al potencial electrostático (desde azul +5 kT/e a rojo -5 kT/e). Abajo, figura representativa de las orientaciones de las moléculas de las figuras superiores. La molécula de palmitato unida es mostrada como esferas de *van der Waals*.

Discusión

Caracterización óptica e hidrodinámica de YLSCP2

Las SCP2 de mamíferos han sido profusamente estudiadas en sus aspectos biofísicos desde su descubrimiento [Stolowich, 1997; Frolov, 1996; Schroeder, 1995]. Por otra parte, existen datos parciales sobre las propiedades biofísicas de las SCP2 de insectos [Dyer, 2008] y nuestro propio laboratorio fue pionero en la investigación de la SCP2 de levaduras [Ferreira, 2006]. No obstante estos antecedentes, era necesario re-investigar las propiedades de YLSCP2 en solución porque los datos anteriores habían sido obtenidos con preparaciones que se demostraron no libres de ligandos endógenos.

La obtención de apoproteína pura descrita en esta tesis fue un punto de inflexión en el estudio biofísico de la misma. Por un lado permitió definir las propiedades ópticas y estado de agregación de referencia para esta proteína, y por otro lado permitió realizar por primera vez experimentos realmente representativos de unión de distintos ligandos.

En cuanto al espectro de dicroísmo circular de YLSCP2, se muestra en esta tesis que la apoproteína tiene una actividad rotatoria algo menor que la de la proteína unida a ligandos adventicios. Por otra parte, el espectro de YLSCP2 evidencia un mayor grado de elipticidad molar a 220 nm, comparado con lo publicado anteriormente para las SCP2 de mamíferos [Stolowich, 1997; Frolov, 1996]. Diferencias como estas son explicadas normalmente como debidas a una disminución del contenido de hélice α . Concuerda con esta interpretación que por RMN, se encuentra que en solución la SCP2 humana posee tres hélices α , es decir, dos hélices α menos que lo obtenido por cristalografía [Frolov, 1996]. En base a todo lo anterior, se concluye aquí que, a diferencia de lo que ocurre con las SCP2 de otras fuentes, YLSCP2 preserva en solución las hélices α observadas en los cristales. En el caso de las SCP2 de mamíferos la energía necesaria para la consolidación de las hélices inestables sería aportada por las interacciones cristalográficas. En el caso de YLSCP2 estas hélices son estables *per se* y estarían presentes en solución y en el cristal. El resultado observado no se explica por una diferencia intrínseca en la estabilidad de las hélices (es decir por diferencias

de secuencia). En efecto, una comparación de la estabilidad teórica usando el programa AGADIR [Muñoz & Serrano, 1994] indicó que no existen diferencias significativas entre las especies (no mostrado). Lamentablemente, este punto no pudo ser explicado con la evidencia actual y su resolución aguarda la realización de nuevos experimentos.

El análisis del estado hidrodinámico de YLSCP2 mediante dispersión elástica de la luz demostró que esta proteína es capaz de formar un dímero a altas concentraciones. Este resultado está de acuerdo con datos previos de dispersión de bajo ángulo de rayos X [Burgardt, 2009]. La energía de disociación del dímero no sería muy alta, por lo que a mayores diluciones, las mediciones de dispersión de luz evidencian una forma monomérica. Mayores detalles sobre la identidad del dímero se incluyen más abajo en la discusión de los datos obtenidos por difracción de rayos X. Aquí basta remarcar que la potencial formación de un dímero puede ser de gran importancia funcional (por ej., la formación de un dímero en AESCP2L2 permite la unión de, no dos, sino tres ligandos [Dyer, 2008]). Si bien la dimerización requiere altas concentraciones, quizás no alcanzables en la matriz celular o peroxisomal, la asociación podría ocurrir en membranas (que podrían actuar como estabilizadoras de la estructura dimérica).

Unión de ligandos

El estudio de la interacción de proteínas con ligandos de distinto tipo está plagado de dificultades metodológicas y técnicas. Más difícil aún es la caracterización de la interacción de proteínas con ligandos hidrofóbicos. La tendencia de estos ligandos a asociarse para formar micelas es la fuente principal de dicha dificultad.

A pesar de estos inconvenientes, en esta tesis logramos desarrollar un único método robusto para medir constantes de disociación de la mayor parte de ligandos lipídicos. Para ello hubo que desarrollar también, la matemática necesaria para ajustar el desplazamiento de un ligando fluorescente unido a YLSCP2 por otro ligando no fluorescente, teniendo en cuenta el equilibrio micelar del ligando desplazante (ver “Materiales y Métodos” sección “Unión de ligandos no fluorescentes por desplazamiento de ácido *cis*-parinárico”).

Fue mediante esta técnica que logramos comprobar que YLSCP2 posee la habilidad de unir con gran afinidad una gran variedad de ligandos hidrofóbicos y determinamos las K_D para

el ácido *cis*-parinámico (AP), ácido palmítico, ácido oleico, ácido esteárico, palmitoil-coenzima A, oleil-coenzima A, estearoil-coenzima A y dodecil sulfato de sodio (SDS), todas del orden nano molar. De esta forma, y a diferencia de otros trabajos en lo que solo se reporta la concentración de ligando que desplaza el 50% del ligando unido, conseguimos hallar las K_D de varios ligandos; pero principalmente conseguimos un método y modelo que permite calcular la afinidad de YLSCP2 por casi cualquier ligando deseado.

Estructura de rayos X de YLSCP2

La estructura de rayos X reportada en esta tesis expande significativamente el conjunto de dominios SCP2 de eucariotas caracterizados, ya que incluye un representante del reino *Fungae*, el cual se agrega a los de *Bacteria* y *Archaea* [Dyer, 2008; Goroncy, 2010; Stanley, 2006; Choinowski, 2000; Dyer, 2009; Dyer, 2003] . De esta forma, el conjunto de información conformacional disponible ofrece la oportunidad de realizar un examen comparativo de este ubicuo plegado proteico y sus propiedades, en contextos celulares muy diferentes.

Respecto de la estructura cuaternaria muchos de los dominios SCP2 descritos hasta el momento no muestran evidencia de asociación homodimérica. Las dos excepciones son la SCP2L2 de *Aedes aegypti* y la SCP2 de la arquea *Archaeoglobus fulgidus* (AFSCP2): los cristales de la proteína de insecto contienen un dímero en la unidad asimétrica con simetría C2 y la proteína se comporta como dímero en solución [Dyer, 2008]; la SCP2 de Arquea también forma un complejo, apretado, con simetría C2 y homodimérico, intercalando las hélices α C-terminales entre las subunidades cristalográficamente relacionadas. La estructura de YLSCP2 revela un dímero estable en la unidad asimétrica. Esto confirma la dependencia del estado de agregación con la concentración de YLSCP2 a la hora de formar dímeros o agregados de orden aún mayor [Burgardt, 2009]. Sorprendentemente, y al contrario de SCP2L2 y AFSCP2, el homodímero de YLSCP2 no posee simetría C2 y abarca diferentes superficies de interacción en cada subunidad, la cual es una forma muy inusual de homodimerización. Queda claro entonces que el estado de agregación del dominio SCP2 no está conservado a lo largo de las especies y se observa un comportamiento distintivo en términos de la forma particular de dímero. Ya que el estado de agregación, sin lugar a

dudas, tiene impacto en los mecanismos por los cuales SCP2 lleva a cabo su función, debe ser considerado caso por caso.

El plegado global de la cadena principal de YLSCP2 es prácticamente idéntico al de la proteína humana MFE2SCP2. Sin embargo, todos los dominios SCP2 caracterizados tienen plegados muy similares y difieren sólo en los detalles específicos. YLSCP2, como el resto de las proteínas SCP2, hace uso de aproximadamente un tercio de los residuos distribuidos a lo largo de todos sus elementos de estructura secundaria para construir una cavidad hidrofóbica interna funcional. Este requerimiento funcional es la explicación más probable para la baja variación conformacional del plegado: considerando que para funcionar, la mayor parte de las proteínas sólo necesitan conservar rigurosamente la estructura tridimensional de segmentos específicos de la cadena principal, SCP2 necesita hacer lo mismo pero prácticamente con todos ellos.

La comparación de los dominios SCP2 conocidos revela diferencias sutiles que arrojan luz a los principios con los cuales el sitio de unión de estas proteínas es construido y sobre su función. A nivel de la cadena principal, toda la lámina β y el motivo $\alpha 1$ -loop- $\alpha 4$ son prácticamente idénticos en todas las estructuras de SCP2. Por otro lado, las hélices $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 5$ concentran las fluctuaciones conformacionales variante-dependientes que forman y definen las características del sitio de unión. Particularmente interesantes son los cambios en $\alpha 2$, la cual, en insectos, está distintivamente desplegada para crear una nueva cámara interna para el ligando, y la hélice $\alpha 5$ cuya posición y largo determinan el volumen y compartimentalización del sitio de unión. Es más, la hélice $\alpha 5$ parece tener múltiples y cruciales roles en SCP2: es el dominio de interacción en el complejo entre HSCP2 y el receptor de importación peroxina PEX5p, responsable de la traslocación de SCP2 a la matriz peroxisomal [Stanley, 2006]; y, como se mencionó, participa en la homodimerización del dominio SCP2 de arquea. Estos roles de la hélice C-terminal involucran movimientos determinantes en el *loop* que conecta los cordones $\beta 4$ y $\beta 5$. Es interesante que este *loop* está formado por residuos altamente conservados, especialmente una glicina que está conservada en todos los dominios SCP2.

El volumen de la cavidad central del dominio SCP2 es su rasgo estructural principal. Desde el punto de vista del plegado proteico, este hecho presenta una pregunta fundamental:

¿Cómo consensuar la necesidad de un núcleo hidrofóbico bien empaquetado con la necesidad funcional de poseer una gran cavidad interna? Con respecto a esto, SCP2 adopta una lógica estructural radicalmente diferente, comparada con otras proteínas de unión a ácidos grasos. Las FABP, por ejemplo, las cuales poseen cavidades similares a las SCP2, tienen una superficie interna particularmente hidrofílica, llena de un gran número de moléculas de agua organizadas [Lücke, 2002]. El agua está prácticamente ausente en el interior de todas las estructuras SCP2 reportadas hasta la fecha, y los átomos que yacen en las cavidades son, con una diferencia abrumadora, carbonos.

Entonces, donde las FABP parecen estabilizar su superficie interna imitando tanto como les sea posible una superficie proteica normal, los dominios SCP2 lo hacen de forma diferente. Los mecanismos comunes de estabilización no se deducen de forma obvia a partir de la comparación de las formas apoSCP2. Sin embargo, las formas apo tienden a tener una cavidad significativamente más reducida. Es más, la cavidad prácticamente es eliminada en la SCP2 humana unida a PEX5p. Estas contracciones de la cavidad están mediadas por movimientos tipo ‘bisagra’ de los cuerpos rígidos $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 5$ y probablemente bastan para bajar la energía de las estructuras sin ligando a niveles aceptables para un plegado apropiado.

Al contrario de la mayoría de las interacciones proteína-ligando que recaen fuertemente en contactos polares y direccionales, la unión de cadenas carbonadas a SCP2 está mediada principalmente por interacciones de *van der Waals* carbono-carbono. Este tipo de interacciones son mucho menos restrictivas en términos geométricos, y por eso el ligando hidrofóbico yace ‘suelto’ en la cavidad y puede incluso adoptar orientaciones diferentes. Más que un modelo de llave y cerradura, los sitios de unión de las SCP2 parecen ser contenedores hidrofóbicos, lo suficientemente amplios para acomodar al ligando en una variedad de orientaciones y posiciones. Con respecto a esto, la información provista por la estructura de rayos X de YLSCP2 es de vital importancia. Las únicas estructuras conocidas con un ligando fisiológico eran las de insecto. Y, en éstas, al menos dos orientaciones del ligando fueron observadas. Una de estas orientaciones fue hallada en YLSCP2 también, y concuerda con la posición adoptada por la molécula de Tritón en MFE2SCP2. Es decir que las diferentes orientaciones fueron confirmadas en más de una estructura y deben ser

consideradas relevantes.

La falta de restricciones geométricas en el sitio de unión es consistente con la baja especificidad de unión de SCP2. La falta de restricciones geométricas en el sitio de unión, a su vez, significa menos restricciones a nivel de la secuencia. En efecto, la única restricción para reclutar los residuos que conforman el sitio de unión parece ser la naturaleza hidrofóbica de su cadena lateral y cambios de volúmenes compensados. Ningún residuo específico, al que se le pueda adscribir un rol estructural definido, está conservado en el sitio de unión de estos dominios.

En resumen, reportamos la primera estructura de rayos *X* de un dominio SCP2 de hongos. Nuestros resultados confirman que el plegado SCP2 está muy bien conservado en todas las formas de vida, y que su rasgo estructural principal es una cavidad interna realmente grande, construida por una fracción significativa de los residuos. El tamaño y forma de la cavidad están modulados por fluctuaciones específicas de la cadena principal que pueden expandir o desaparecer la cavidad, probablemente para permitir la unión de ligandos hidrofóbicos con baja selectividad y la estabilidad de la forma sin ligando. Algo distintivo es que la cavidad de unión de los dominios SCP2 está tapizada principalmente por átomos de carbono, sin presencia de interacciones polares ni moléculas de agua detectables cristalográficamente, lo que permite considerables márgenes en las orientaciones de los ligandos unidos. Es más, no pudieron identificarse residuos comunes examinando todas las estructuras con ligando disponibles, lo que remarca la falta de restricciones fuertes en la geométrica de la interacción proteína-ligando. La caracterización general presentada en esta tesis ayudará a diseñar futuras investigaciones dirigidas a abordar, en todos los organismos vivientes, la relación estructura-función de este importante factor metabólico.

Conclusiones

En esta tesis se desarrolló un robusto y eficiente protocolo de preparación y purificación de YLSCP2 que permite tanto su cristalización, como su obtención y estudio en su forma libre de ligando. La estructura de rayos *X* reportada expande significativamente el conjunto de dominios SCP2 de eucariotas y unifica el conocimiento sobre este dominio a lo largo de todos los reinos de la vida. De esta forma existe la posibilidad de realizar un completo examen comparativo de este ubicuo plegado proteico y sus propiedades.

La estructura 3D de YLSCP2 revela un dímero estable en la unidad asimétrica. Esto termina de confirmar la dependencia del estado de agregación con la concentración de YLSCP2. Sin embargo, el dímero no posee la típica simetría C2, sino que abarca diferentes superficies de interacción en cada subunidad, la cual es una forma muy inusual de homodimerización. El estado de agregación del dominio SCP2 no está conservado a lo largo de las especies. Aún resta determinar con exactitud la concentración a la cual la dimerización ocurre, su relevancia biológica y determinar si, además de ser dependiente de la concentración de YLSCP2, también es dependiente de la concentración de ligandos.

YLSCP2 fue capaz de unir ligandos hidrofóbicos de diferente clase. Pero más importante aún es que a lo largo del trabajo se pudo desarrollar un modelo matemático que explica el comportamiento de la unión de YLSCP2 a ligandos no fluorescentes por desplazamiento de un ligando fluorescente, teniendo en cuenta el equilibrio micelar del ligando desplazante.

Materiales y Métodos

Biología Molecular

El gen de YLSCP2

El clonado del gen que codifica a YLSCP2 y posterior subclonado en el vector de expresión *pET9bylscp2* fue descripta anteriormente [Ferreira, 2006].

Abreviaturas	Nombre	Composición
LB	Luria-Bertani	NaCl 10 g/L, triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L
LB-kanamicina	Luria-Bertani-kanamicina	NaCl 10 g/L, triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, kanamicina 50 µg/mL
LB-kanamicina-agar	Luria-Bertani-kanamicina-agar	NaCl 10 g/L, triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, kanamicina 50 µg/mL, agar 15 g/L
SOC	SOC	NaCl 0.5 g/L, triptona 20 g/L, extracto de levadura 5 g/L, KCl 2.5 mM, MgCl ₂ 10 mM, glucosa 20 mM, pH 7.0 (0.2 mL NaOH 5 M)

Tabla I. Composición de los medios de cultivo [Sambrook, 1989].

Producción de bacterias competentes

El precultivo de bacterias competentes se preparó inoculando 2 mL de medio LB con una provisión de bacterias *Escherichia coli* BL21 (DE3), e incubando a 37 °C y 220 rpm durante 16 horas. Este precultivo se agregó sobre 200 mL de medio LB fresco y se incubó a 37 °C y 220 rpm hasta DO₆₀₀≈0.5. Entonces, el cultivo se transfirió a un tubo de centrifuga estéril, se dejó reposar en hielo durante diez minutos y se centrifugó a 5000 × g (rotor JA-14, Beckman, EE. UU.) durante otros diez minutos a 4 °C. El sobrenadante se descartó y la biomasa se disolvió suavemente en 200 mL de glicerol 10% v/v, en baño de hielo. Esta solución se centrifugó y se repitió sucesivamente el paso anterior disolviendo en 100, 50, 25 y finalmente en 0.4 mL de glicerol 10% v/v. La solución final se fraccionó en alícuotas

de 80 µL que luego se almacenaron a -80 °C.

Transformación de bacterias *Escherichia coli* BL21 (DE3)

Las bacterias *E. coli* de la cepa BL21 (DE3) [*hsdSgal* (λ *clts857 ind1Sam7nim5 lac UV5-T7 genc1*)] fueron transformadas con *pET9bylscp2* para expresar la proteína. Para transformar las bacterias se electroporaron 80 µL de bacterias competentes (descongeladas a 4 °C) con 1-2 µL del vector *pET9bylscp2* (10 ng obtenidos de *Escherichia coli* JM109). La celda de electroporación (0.2 cm) se enfrió en hielo y el electroporador (Bio-Rad) se programó a 2.5 kV. Las bacterias transformadas se incubaron en 1 mL de medio de cultivo SOC (Tabla I) durante 1 hora a 37 °C y 220 rpm y luego se utilizaron para inocular una placa de Petri con medio LB-kanamicina-agar (Tabla I).

Las colonias positivas se aislaron, se resuspendieron en glicerol 10% v/v y se conservaron a -80 °C [Sambrook, 1989].

Obtención y caracterización preliminar de YLSCP2

Expresión de YLSCP2 en *Escherichia coli* BL21 (DE3)

La selección de un clon adecuado fue realizada mediante ensayos de expresión a pequeña escala. Para esto fueron realizados precultivos líquidos de células *Escherichia coli* BL21 (DE3) transformadas con *pET9bylscp2* (1 mL de LB-kanamicina) 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 $DO_{600} \approx 1.0$. El control de preinducción consistió 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 a 200 rpm. Las bacterias fueron cosechadas por centrifugación ($5000 \times g$, 10 min) y la biomasa fue disuelta en *buffer* LC (Tabla II). 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% p/v. Una vez obtenido el clon adecuado, una provisión de bacterias con 15% glicerol fue almacenada a -80 °C [Sambrook, 1989].

La expresión de YLSCP2 a gran escala se realizó inoculando un precultivo de 100 mL de LB-kanamicina con la provisión de bacterias almacenada a -80 °C. El precultivo se incubó durante toda la noche, ~12 horas a 30 °C y 150 rpm y luego se utilizaron alícuotas de 50 mL para inocular 2 *erlenmeyers* con un litro de medio LB-kanamicina. Los cultivos se incubaron a 37 °C y 200 rpm hasta alcanzar una $DO_{600} \approx 1.0$ (aprox. 2 horas). La expresión de YLSCP2 se indujo con el agregado de lactosa sólida 1% *p/v* y después de 3 horas de inducción las bacterias se cosecharon por centrifugación ($5000 \times g$, 15 min, 4 °C). La biomasa obtenida se pesó y almacenó a -20 °C.

Abreviatura	Nombre	Composición
<i>Buffer</i> LC	lisis celular	Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, NaCl 100 mM, EDTA 1mM
<i>Buffer</i> SB	electroforesis	Tris-HCl 50 mM, pH 6.8, glicerol 12% <i>v/v</i> , SDS 8% <i>p/v</i> , azul de bromofenol 0.005% <i>p/v</i>
<i>Buffer</i> A	purificación	acetato de sodio 25 mM, pH 5.2, urea 8M, glicina 10 mM
<i>Buffer</i> A'	purificación'	ácido acético 50 mM, pH 4.76, urea 8M, glicina 10 mM
<i>Buffer</i> B	diálisis	fosfato de sodio 50 mM, pH 7.0
<i>Buffer</i> C	cromatografía de exclusión molecular	fosfato de sodio 20 mM, pH 7.0
<i>Buffer</i> D	digestión	bicarbonato de amonio 100 mM, pH 8.5

Tabla II. Composición de las soluciones para proteínas.

Electroforesis

La electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% *p/v* con SDS (SDS-PAGE) fue realizada como se describe en [Schägger & von Jagow, 1987]. Las muestras a analizar se diluyeron al medio en *buffer* SB (Tabla II), con β -mercaptoetanol 4% *v/v* agregado en el momento. Luego, estas mezclas se calentaron a 100 °C durante 10 min y se sembraron. En paralelo se analizó un patrón de proteínas de pesos moleculares conocidos para determinar el peso aparente de cada banda. Normalmente fue aplicado un voltaje constante de 100 V, y el tiempo de corrida se ajustó para que la integral del voltaje en función del tiempo sea $250 \text{ V} \times \text{h}$ (2 h). Al finalizar la corrida los geles se tiñeron con *Coomasie® Brilliant Blue* R250 0.3% *p/v* en etanol:ácido acético:agua (3:1:6) y luego se decoloran con una solución de etanol:ácido acético:agua (3:1:6) hasta la visualización de las bandas. Después de desteñidos, los geles se conservaron en ácido acético 5% *v/v*.

Para estimar el grado de pureza de la muestra se tuvo en cuenta que la sensibilidad del

Coomasie® Brilliant Blue R250 es 0.1 µg y se sembraron cantidades crecientes de YLSCP2 replegada. Se tomó nota de la calle en que apareció la primera contaminación (y de la masa de YLSCP2 en dicha calle, por ej. 15 µg en la Fig. 2 de “Resultados”) y se llevó a cabo una sencilla regla de tres simple (en el mismo ejemplo, $0.1 \times 100 / 15 = 0.66\%$ de contaminantes).

Obtención de cuerpos de inclusión

Las bacterias se disolvieron en 10 mL de *buffer* LC por cada 5 g de biomasa y se realizó la ruptura celular aplicando una presión de 1000 psi (French Pressure Cell Press, Thermo IEC, Needham Heights, MA, USA). La solución obtenida se centrifugó ($12000 \times g$, 4 °C, 15 min) y se descartó el sobrenadante (rotulado “SN 1”). El precipitado se disolvió en la mitad del volumen de *buffer* LC usado en el primer paso y se agregaron lisozima 0.2 mg/mL, DNAsa 0.01 mg/mL y $MgCl_2$ 10 mM. Esta solución se incubó durante 30 min a 37 °C, se centrifugó ($12000 \times g$, 4 °C, 15 min) y se conservó el precipitado (se descartó el sobrenadante 2, “SN 2”). Este tratamiento con lisozima y DNAsa se repitió una vez (generando un “SN 3”) y luego el precipitado se disolvió en *buffer* LC conteniendo Tritón® X-100 0.5% v/v. Esta solución se incubó diez minutos a temperatura ambiente con agitación y se centrifugó ($12000 \times g$, 4 °C, 15 min, SN 4). Finalmente se lavó tres veces el precipitado con agua desionizada (“SNs 5, 6 y 7”) y los cuerpos de inclusión (CI) se almacenaron a -20 °C.

Purificación

Los CI se disolvieron en 6 mL de *buffer* A (Tabla II) a 37 °C, con agitación suave, durante 1 hora. Luego se centrifugó ($12000 \times g$, 4 °C, 15 min) y se conservó la fracción soluble (rotulada como “siembra”). La purificación de YLSCP2 se realizó mediante cromatografía de intercambio iónico. La matriz SP Sepharose fast-flow (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) se acondicionó de acuerdo a las instrucciones del fabricante y luego es equilibró con *buffer* A. La fracción soluble de los cuerpos de inclusión se sembró en la matriz y luego la columna se eluyó con un gradiente escalonado de NaCl en fracciones de 6 mL (0, 0.25, 0.5 y 2 M). El contenido de proteína en cada fracción se determinó por absorbancia a 280 nm y SDS-PAGE. Todas las fracciones que contuvieron YLSCP2 fueron combinadas

para obtener una única muestra homogénea (fracciones 0.25 y 0.5 M NaCl), y se la almacenó a -20 °C. Finalmente, una alícuota de esta muestra se dializó contra *buffer* B (Tabla II) a 4 °C, utilizando una membrana de 10 kDa de corte (Pierce, Rockford, U.S.A.) y realizando 3 cambios de 1 litro de *buffer* B de 5, 5 y 12 horas de incubación cada uno. El grado de pureza de la muestra final de YLSCP2 se analizó por SDS-PAGE.

Posteriormente se realizó una cromatografía de exclusión molecular por FPLC (JASCO LC-NetII/ADC) con una matriz SuperdexTM 75 101300 GL (GE, Healthcare) equilibrada en *buffer* B (Tabla II) o *buffer* C en caso de que se utilizara para cristalizar, utilizando un flujo de 0.4 mL/min. La columna fue lavada previamente con etanol 70% v/v y urea 8 M. Antes y después de este paso la proteína se concentró (aproximadamente 4 veces, dependiendo de la finalidad) con dispositivos de concentración CENTRICON[®] o CENTRIPREP[®] (Millipore, Bedford, MA) con corte en 10000 Da.

Finalmente el protocolo fue adaptado para obtener una preparación libre de ligandos. Con este fin en lugar de resuspender los CI en *buffer* A se utilizó *buffer* A', y de igual forma la IEC es equilibrada en *buffer* A'. Además el *buffer* A' fue tratado previamente en *bach* con AmberliteTM XADTM-16 (1 g Amberlite:10 g urea) y lo mismo se realizó con la “siembra” (1 g Amberlite:1 mL siembra). Se recuperaron las soluciones y se descartó el AmberliteTM XADTM-16. Incluso la bolsa de diálisis se trató con AmberliteTM XADTM-16 y los recipientes donde se efectuó la diálisis fueron tratados con sulfocrómica. La SuperdexTM 75 se limpió primero con etanol 70% v/v (etanol que se chequeó no tuviese ácidos grasos), y luego con urea 8 M previamente tratada con AmberliteTM XADTM-16.

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.

Estabilidad (tripsinólisis)

Se mezclaron 10 µL de YLSCP2 3.5 mg/mL (35 mg) con 10 µL de tripsina 0.035 mg/mL

(0.35 mg) y se interrumpió la reacción al tiempo deseado e indicado con 20 μ L de SB 4% v/v β -MeOH. En el caso del control negativo se agregó SB previo a la tripsina. La YLSCP2 se encontraba en *buffer* fosfato 50 mM, pH 7.0 y la tripsina se preparó en *buffer* carbonato de amonio 100 mM, pH 8.0.

Propiedades ópticas de YLSCP2: Determinación de la concentración proteica (absorción UV) y espectroscopía de dicroísmo circular

La concentración de proteína es determinada por absorción UV en unidades arbitrarias, 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 [Ferreira, 2006].

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 [Cantor & Schimmel, 1980]. El ajuste de la Ecuación 1 al espectro entre 320 y 340 nm mediante regresión no lineal (Solver[®] Excel, Microsoft Corporation 1985-1999, U.S.A.) 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.

$$S = a + b\lambda^{-c} \quad \text{Ecuación 1}$$

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 [Fasman, 1996]. 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 (0-100 °C).

En el UV lejano (180-240 nm) fue utilizada una celda de 0.1 cm de paso óptico, 100 miligrados de sensibilidad, 50 nm/min de velocidad de barrido, 1 s de tiempo de integración espectral, 1 nm de ancho de banda y se colectaron datos cada 0.5 nm. 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 paso óptico, 5 miligrados de sensibilidad, 50 nm/min de velocidad de barrido, 1 s de tiempo de integración espectral, 1 nm de ancho de banda y se colectaron datos cada 0.2 nm. 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 tres veces mayor, la cual se especifica en los resultados.

Rutinariamente se realizaron diez espectros de CD para cada muestra, los cuales se promediaron, y corrigieron por la actividad dicróica del blanco, se ajustó la línea de base utilizando como cero el valor promedio de la lectura entre 320-340 nm y finalmente se realizó un suavizado mediante filtro Savitzky-Golay de cuarto grado, con una ventana de diez puntos [Press, 1992].

La elipticidad molar fue calculada aplicando la Ecuación 2, 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 paso óptico de la celda en centímetros.

$$[\theta] = \frac{\theta}{10[c]nl} \quad \text{Ecuación 2}$$

En el caso del cálculo de afinidad YLSCP2-ácido parinárico, se siguió por CD cercano y se utilizó la señal a 270 nm como blanco (punto isosbético) y la señal a 309 como sonda para calcular la afinidad (banda de absorción de ácido parinárico).

La elipticidad molar se mide siempre en $\text{grados cm}^2 \text{dmol}^{-1}$.

Estado de agregación (comportamiento hidrodinámico)

Se realizó una SEC-FPLC en un equipo Jasco LC-NetII/ADC con una columna Superdex™ 75 10/300 GL (GE Healthcare). Flujo 0.4 mL/min. Como marcadores de peso

se corrieron BSA (66.3 KDa), β -lactamasa (29.45 KDa), nucleasa (18 KDa), mioglobina (16.8 KDa), RNAsa (13.7 Kda) y aprotinina (6.5 KDa).

El R_s de YLSCP2 fue calculado a partir de su peso molecular (PM) aplicando la Ecuación 3 [Uversky, 1993; Uversky, 1994].

$$\log(R_s) = 0.369 \times \log(PM) - 0.254 \quad \text{Ecuación 3}$$

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

Detección de ligandos endógenos

Cromatografía en capa delgada

Se homogenizó la muestra en cinco volúmenes de Folch (cloroformo:metanol 2:1) en *vortex* y luego se separaron las fases por centrifugación ($2000 \times g$, 15 min.). Se descartó la fase superior, y la inferior se secó por gaseado con nitrógeno. Se resuspendieron los lípidos en 1 mL de cloroformo y se volvieron a secar con nitrógeno hasta alcanzar 100-200 μ L aproximadamente.

Las placas de corrida fueron de silica gel (60 F₂₅₄ EM Science), y primero se las secó 1 h a 121 °C. Se realizó un doble desarrollo. Primero se utilizó una mezcla de solventes para resolver lípidos polares (que simultáneamente arrastra a todos los lípidos neutros por igual) y se los dejó correr hasta la mitad de la placa. Luego se secó la placa y se la colocó en una segunda cuba con la mezcla de solventes que resuelve los lípidos neutros (y no moviliza los polares). La primera mezcla consistió en cloroformo:metanol:ácido acético:agua (100:75:7:4); y la mezcla utilizada para resolver lípidos neutros fue ciclohexano:éter etílico:ácido fórmico (40:10:1). Luego se secó nuevamente la placa y se la dejó en una cuba con yodo hasta revelar las bandas. Como control se utilizó palmitato.

Caracterización Funcional de YLSCP2

Modelo para un sitio de unión

La unión de ligandos a YLSCP2 fue analizada aplicando un modelo de un único sitio de unión (Ecuaciones 4-8) [Miller, 1983]. En este modelo, una molécula de ligando (L) se une a una molécula de proteína (P), con una constante de disociación K_D (Ecuación 4). La concentración de proteína ($[P]$) y de ligando ($[L]$) en el equilibrio están definidas por las Ecuaciones 5 y 6, 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.

$$[P] + [L] \rightleftharpoons [PL] \Rightarrow K_D = \frac{[P][L]}{[PL]} \quad \text{Ecuación 4}$$

$$[P] = [P_0] - [PL] \quad \text{Ecuación 5}$$

$$[L] = [L_0] - [PL] \quad \text{Ecuación 6}$$

Reemplazando la Ecuación 5 y 6 en la ecuación de la constante de disociación (Ecuación 4) y despejando $[PL]$, se obtiene una ecuación cuadrática (Ecuación 7).

$$[PL]^2 - ([P_0] + [L_0] + K_D)[PL] + [P_0][L_0] = 0 \quad \text{Ecuación 7}$$

La raíz de esta cuadrática (Ecuación 8) que tiene sentido físico nos permitió calcular la concentración de complejo.

$$[PL] = \frac{([P_0] + [L_0] + K_D) - \sqrt{([P_0] + [L_0] + K_D)^2 - 4[P_0][L_0]}}{2} \quad \text{Ecuación 8}$$

Unión de ácido parinámico

La fluorescencia fue medida siempre en unidades arbitrarias 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. Pero además cada vez que se utilizó el equipo se midió una solución de triptofano (que luego se guardaba a -20 °C) para ajustar el fotomultiplicador de manera que la fluorescencia ($\lambda_{\text{exc}}=290$ nm y $\lambda_{\text{em}}=350$ nm) de la solución de triptofano 0.1 mM fuera siempre 100. Esto nos permitió comparar resultados

obtenidos en distintos días.

Para el ligando intrínsecamente fluorescente (ácido parinámico) fue utilizada la metodología que se describe a continuación. Los espectros de fluorescencia fueron realizados con una cubeta de 1.0 cm de paso óptico, termostatzada a 20 °C.

Las muestras fueron preparadas en *buffer* B, y la titulación de proteína con ligando fue seguida por la fluorescencia propia del ligando luego de incubar al menos dos minutos.

La concentración de la solución de madre de ácido *cis*-parinámico (AP, 3 mM en etanol, Molecular Probes), fue corroborada por absorbancia ($\epsilon_{304\text{nm}}=78000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [Sklar, 1977]). 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. La concentración de YLSCP2 fue $\sim 4 \mu\text{M}$.

La señal medida está relacionada con la concentración de complejo proteína-ligando ($[PL]$) y de ligando libre por la Ecuación 9, 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.

$$Y = Y_L ([L_0] - [PL]) + Y_{PL} [PL] \quad \text{Ecuación 9}$$

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

Unión de ligandos no fluorescentes por 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 ($\sim 4 \mu\text{M}$). Esta solución fue titulada con una solución concentrada del ligando desplazante correspondiente (1 o 2 mM), dejando reaccionar unos minutos antes de medir. El desplazamiento fue seguido por la disminución de 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: ácido palmítico, ácido oleico, ácido esteárico, palmitoil-coenzima A, oleil-coenzimaA, estearoil-coenzimaA, colesterol, dipalmitoilglicerol (DPG) y dodecil sulfato de sodio (SDS). La concentración de los ligandos fue calculada solo por pesada excepto para los ésteres de CoA que se corroboraron por absorbancia de la CoA ($\epsilon_{260\text{nm}}=14700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), al igual que el ácido parínárico ($\epsilon_{304\text{nm}}=78000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Los datos obtenidos fueron analizados asumiendo un único sitio 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 10 y 11) 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 [Wang, 1995].

$$[P] + [A] \rightleftharpoons [PA] \Rightarrow K_A = \frac{[PA]}{[P][A]} \quad \text{Ecuación 10}$$

$$[P] + [B] \rightleftharpoons [PB] \Rightarrow K_B = \frac{[PB]}{[P][B]} \quad \text{Ecuación 11}$$

Por conservación de masas se obtienen las ecuaciones necesarias para calcular las concentraciones de ligando A, ligando B y proteína, en el equilibrio (Ecuaciones 12-14).

$$[A] = [A_0] - [PA] \quad \text{Ecuación 12}$$

$$[B] = [B_0] - [PB] \quad \text{Ecuación 13}$$

$$[P] = [P_0] - [PA] - [PB] \quad \text{Ecuación 14}$$

Reemplazando las Ecuaciones 12-14 en las Ecuaciones 10 y 11 se obtienen las ecuaciones para $[PA]$ y $[PB]$, con las que luego, reemplazando en la ecuación de masa para la proteína, se obtiene una ecuación cúbica para la concentración de proteína (Ecuación 15).

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

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

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

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

Ecuación 15

A partir de la única solución con sentido físico para esta ecuación cúbica (Ecuación 16) se obtienen las expresiones para $[PA]$ (Ecuación 17) y $[PB]$ (Ecuación 18).

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

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

Ecuación 16

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

Ecuación 17

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

Ecuación 18

La señal de fluorescencia observada (Y) depende de la concentración de complejo y de ligando libre según la Ecuación 19, 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 19

La constante de disociación para el ligando B se obtuvo ajustando la Ecuación 19 a los resultados experimentales mediante regresión no lineal (Solver[®], Excel).

Desplazamiento de ácido *cis*-parinámico por ligandos que forman micelas

En el caso de que el ligando desplazante B formara micelas en el rango de concentración usado en el experimento se tuvo en cuenta este equilibrio micelar, ya que dicho ligando B dejaría de desplazar a A a la concentración que comenzara a formar micelas. Entonces n es

el número de moléculas de B por micela, $[B_n]$ la concentración de micelas y $n[B_n]$ la concentración de B en micelas.

Teniendo en cuenta esto la Ecuación 13 quedaría:

$$[B] = [B_0] - [PB] - n[B_n] \quad \text{Ecuación 13'}$$

Y la Ecuación 15 sería ahora:

$$\begin{aligned} [P]^3 + a[P]^2 + b[P] + c &= 0 \\ a &= K_A + K_B + [A_0] + [B_0] - [P_0] - n[B_n] \\ b &= K_B([A_0] - [P_0]) + K_A([B_0] - [P_0]) + K_A K_B - K_A n[B_n] \\ c &= -K_A K_B [P_0] \end{aligned} \quad \text{Ecuación 15'}$$

$[B_n]$ no se conoce y podría calcularse como $[B]^n / [B_n] = K \Rightarrow [B_n] = [B]^n / K$, pero de esta forma estaríamos agregando un equilibrio nuevo y por ende una constante más y el polinomio final sería de cuarto grado. Es por esto que decidimos modelar dicho equilibrio del siguiente modo.

CMC aparente (CMC') es la concentración de B a partir de la cual el mismo permanece constante (parámetro que estima la concentración micelar crítica, CMC), ya que $[B]$ se mantiene aproximadamente constante cuando el exceso de B va a micelas. Lo mismo sucede con $[PB]$ que permanecerá constante a la misma $[B]$ por la misma razón.

Entonces la fracción monomérica no micelar (f_{nm}) más la fracción monomérica en micelas (f_m) es igual a 1.

Expresado más abreviadamente y despejando $f_{nm} = 1 - f_m$

Hay que tener en cuenta que f_m refiere solo a $n[B_n]$ mientras que f_{nm} a $[PB]$ y $[B]$.

Es decir que $[NM] = [PB] + [B]$, siendo $[NM]$ la concentración de B no presente en micelas.

Entonces, si aproximamos $f_m \approx 1 / (1 + [B_0]/CMC')$, siendo ésta nuestra aproximación,

nos queda $f_{nm} \approx 1 - 1 / (1 + [B_0]/CMC')$.

Finalmente obtenemos:

$$n[B_n] \approx ([B_0] - CMC') [1 - 1 / (1 + [B_0] / CMC')] \quad \text{Ecuación 20}$$

De este modo el polinomio final continúa siendo cúbico y las raíces pueden calcularse de igual modo que antes.

Pero además el proceso de micelarización es un proceso de ‘todo o nada’, es decir que antes de la *CMC* aparente, la concentración de micelas es cero y es por este motivo que $n[B_n]$ se multiplicó por la expresión $[B_0]>CMC$ que de ser falsa iguala $n[B_n]$ a cero, reduciendo la Ecuación 15’ a la Ecuación 15.

Cristalización, difracción y resolución de la estructura tridimensional de YLSCP2

Para cristalizar se utilizó la preparación no libre de ligandos endógenos.

El *buffer* B (Tabla II) se diluyó primeramente durante la cromatografía de exclusión molecular hasta 20 mM, y luego utilizando los dispositivos CENTRICON® se concentró la muestra hasta ~1 mM y se volvió a diluir el *buffer* B en el mismo CENTRICON® hasta 5 mM.

Finalmente se preparó palmitato 100 mM en etanol y se agregó a la muestra cantidad suficiente para obtener una concentración final de palmitato de 10 mM (por lo que la muestra final también contuvo un 10% v/v de etanol). Así se desplazó cualquier otro ligando presente y nos aseguramos que toda la YLSCP2 estuviera unida a palmitato.

Se eligió el método de la gota pendiente o colgante por difusión de vapor para la cristalización. Se colocaron 500 µL de la condición en el pocillo y se mezcló 1 µL de YLSCP2 1 mM con 1 µL de la condición sobre el cubreobjetos, luego es selló con vaselina y se almacenó a 20 °C.

La condición fue 0.1 M HEPES Na, pH 7.0 y 1.4 M citrato de sodio, pH 6.5 y para el posterior congelado en nitrógeno líquido se criopreservó con solución madre nueva 10% v/v PEG 400.

El cristal fue un cuerpo regular de base hexagonal formado luego de cuatro semanas.

Los datos de difracción fueron colectados en la estación X6A del *National Synchrotron Light Source (Brookhaven National Laboratory, NY, EE.UU.)*, usando un detector ADSC

Quantum 270 CCD (*Area Detector Systems Corp., Poway, CA, EE.UU.*), y una temperatura de 100 °K. La resolución fue de aprox. 2 Å y de muy buena calidad. Los datos fueron indexados, integrados, escalados y reducidos usando el programa iMosfilm. Un 5% de las reflexiones, seleccionadas al azar, fueron asignadas para los cálculos del R_{free} .

Para la resolución de la estructura se utilizó el paquete de programas CCP4.

La estructura de YLSCP2 fue obtenida por reemplazo molecular utilizando las coordenadas de MFE2SCP2 (PDB ID:1IKT) como modelo. La solución se halló utilizando Molrep, y los modelos fueron refinados mediante el uso de Refmac5 y manualmente mediante el uso de Coot. El grupo espacial fue $P3_121$, el R_{free} final fue de 0.22 y la resolución 2.2 Å.

Las coordenadas y factores de estructura fueron depositados en el Banco de Datos de Proteínas (PDB) con el código 4JGX.

Bibliografía

Adamski J., Normand T., Leenders F., Monte D., Begue A., Stehelin 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 (1995) 311, 437-43.

Vasily D. Antonenkov, Raija T. Sormunen, Steffen Ohlmeier, Leen Amery, Marc Fransen, Guy P. Mannaerts and J. Kalervo Hiltunen. Biochemistry Journal (2006) 394, 475-484.

Baker NA, Sept D, Joseph S, Holst MJ, McCammon JA. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. Proc Natl Acad Sci USA (2001) 98, 10037-10041.

Barnes T.M., Jin Y., Horvitz H.R., Ruvkun G., Hekimi S. The *Caenorhabditis vi 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 (1996) 67, 46-57.

Barth G, Gaillardin C. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. FEMS Microbiol Rev (1997) 19, 219-37.

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 (1998) 284, 1625-39.

Brown L.A., Baker A. Peroxisome biogenesis and the role of protein import. Journal of Cellular and Molecular Medicine (2003) 7, 388-400.

Burgardt Noelia I., Ferreyra Raúl G., Falomir-Lockhart Lisandro, Córscico Betina, Ermácora Mario R., Ceolín Marcelo. Biophysical characterisation and urea-induced unfolding of recombinant *Yarrowia lipolytica* sterol carrier protein-2. Biochimica et Biophysica Acta (2009) 1794, 1115-1122.

Canevari L, Clark J.B. Alzheimer's Disease and Cholesterol: The Fat Connection. Neurochemical Research, (2007) 32, 739-50.

Cantor C., Schimmel P. Biophysical Chemistry (1980).

Cao H, Gerhold K, Mayers JR, Wiest MM, Watkins SM, Hotamisligil GS. Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. Cell (2008) 134, 933-44.

Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. Science (2001) 294, 1866-70.

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* (2000) 39, 1897-902.

Cirigliano M.C., Carman G.M., Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology* (1984) 48, 747-50.

Dai J, Xie Y, Wu Q, Wang L, Yin G, Ye X, Zeng L, Xu J, Ji C, Gu S, Huang Q, Zhao RC, Mao Y. Molecular cloning and characterization of a novel human hydroxysteroid dehydrogenase-like 2 (HSDL2) cDNA from fetal brain. *Biochem Genet* (2003) 41, 165-74.

Dell'Angelica EC, Stella CA, Ermácora MR, Ramos EH, Santome JA. Study on fatty acid binding by proteins in yeast. Dissimilar results in *Saccharomyces cerevisiae* and *Yarrowia lipolytica*. *Comp Biochem Physiol B* (1992) 102, 261-5.

Dell'Angelica EC, Ermacora MR, Santome JA. Purification and partial characterization of a fatty acid-binding protein from the yeast, *Yarrowia lipolytica*. *Biochem Mol Biol Int* (1996) 39, 439-45.

Deloukas P., et al. The DNA sequence and comparative analysis of human chromosome 20. *Nature* (2001) 414, 865-71.

Ding XZ, Hennig R, Adrian TE. Lipoxygenase and cyclooxygenase metabolism: new insights in treatment and chemoprevention of pancreatic cancer. *Mol Cancer* (2003) 2, 10.

Dujon B., et al. Genome evolution in yeasts. *Nature* (2004) 430, 35-44.

Duplus E, Glorian M, Forest C. Fatty acid regulation of gene transcription. *J Biol Chem* (2000) 275, 30749-52.

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* (2003) 278, 39085-91.

Dyer D.H., Wessely V., Forest K.T., Lan Q. Three-dimensional structure/function analysis of SCP2-like 2 reveals differences among SCP2 family members. *Journal of Lipid Research* (2008) 49, 644-53.

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* (2009) 326, 67-77.

Edqvist J., Ronnberg 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 (2004) 279, 53544-53.

Edqvist J, Blomqvist K. Fusion and fission, the evolution of sterol carrier protein-2. J Mol Evol (2006) 62, 292-306.

Enoch HG, Catalá A, Strittmatter P. Mechanism of rat liver microsomal stearyl-CoA desaturase. Studies of the substrate specificity, enzyme-substrate interactions, and the function of lipid. J Biol Chem (1976) 1, 5095-103.

Fasman G.D. Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules (1996).

Ferreira Raúl G., Burgardt Noelia I., Milikowski Daniel, Melen Gustavo, Kornblihtt Alberto R., Dell'Angelica Esteban C., Santomé José A., Ermácora Mario R. A yeast sterol carrier protein with fatty-acid and fatty-acyl-CoA binding activity. Archives of Biochemistry and Biophysics (2006) 453, 97-206.

Fickers P, Benetti PH, Waché Y, Marty A, Mauersberger S, Smit MS, Nicaud JM. Hydrophobic substrate utilization by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. FEMS Yeast Res (2005) 5, 527-43.

Filipp F.V., Sattler M. Conformational Plasticity of the Lipid Transfer Protein SCP2. Biochemistry (2007) 46, 7980-91.

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 (1996) 271, 31878-84.

Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. Science (2001) 294, 1871-5.

Gallegos AM, Atshaves BP, Storey SM, Starodub O, Petrescu AD, Huang H, McIntosh AL, Martin GG, Chao H, Kier AB, Schroeder F. Gene structure, intracellular localization, and functional roles of sterol carrier protein-2. Progress Lipid Res (2001) 40, 498-563.

Gallegos AM, Atshaves BP, Storey SM, Starodub O, Petrescu AD, Huang H, McIntosh AL, Martin GG, Chao H, Kier AB, Schroeder F. Gene structure, intracellular localization, and functional roles of sterol carrier protein-2. Progress Lipid Res (2001) 40, 498-563.

Goroncy AK, Murayama K, Shirouzu M, Kuramitsu S, Kigawa T, Yokoyama S. NMR and X-ray structures of the putative sterol carrier protein 2 from *Thermus thermophilus* HB8 show conformational changes. J Struct Funct Genomics (2010) 11, 247-56.

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 SCP2-like Domain of Human Peroxisomal Multifunctional Enzyme Type 2 at 1.75 Å Resolution. *The Journal of Molecular Biology* (2001) 313, 1127-38.

Hannun YA, Obeid LM. The Ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. *J Biol Chem* (2002) 277, 25847-50.

Hettema E.H., Distel B., Tabak H.F. Import of proteins into peroxisomes. *Biochimica et Biophysica Acta* (1999) 1451, 17-34.

Hla T, Lee MJ, Ancellin N, Paik JH, Kluk MJ. Lysophospholipids--receptor revelations. *Science* (2001) 294, 1875-8.

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 maltose*. *Gene* VII (1991) 106, 61-9.

Jayakumar A, Tai MH, Huang WY, al-Feel W, Hsu M, Abu-Elheiga L, Chirala SS, Wakil SJ. Human fatty acid synthase: properties and molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1995) 92, 8695-9.

Joint Center for Structural Genomics (JCSG). Crystal structure of putative sterol carrier protein 2 (2649030) from *Archaeoglobus fulgidus* at 2.11 Å resolution (2007).

Kader JC. Lipid-transfer proteins in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* (1996) 47, 627-654.

Kawashima T, Amano N, Koike H, Makino S, Higuchi S, Kawashima-Ohya Y, Watanabe K, Yamazaki M, Kanehori K, Kawamoto T, Nunoshiba T, Yamamoto Y, Aramaki H, Makino K, Suzuki M. Archaeal adaptation to higher temperatures revealed by genomic sequence of *Thermoplasma volcanium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2000) 97, 14257-62.

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*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* (Korean Society for Microbiology and Biotechnology) (2000) 10, 333-37.

Kohlwein S.D., Paltauf F. Uptake of fatty acids by the yeasts, *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomycopsis lipolytica*. *Biochimica et Biophysica Acta* (1984) 792, 310-17.

Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature* (2000) 404, 635-43.

Kragelund BB, Knudsen J, Poulsen FM. Acyl-coenzyme A binding protein (ACBP). *Biochim Biophys Acta* (1999) 1441, 150-61.

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* (2003) 12, 51-60.

Krissinel E., Henrick K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J. Mol Biol* (2007) 372, 774–797.

Lan Q., Wessely V. Expression of a sterol carrier protein-x gene in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology* (2004) 13, 519-29.

Li H, Robertson AD, Jensen JH. Very fast empirical prediction and rationalization of protein pKa values. *Proteins* (2005) 61, 704–721.

Lücke C, Huang S, Rademacher M, Rüterjans H. New insights into intracellular lipid binding proteins: the role of buried water. *Protein Sci* (2002) 11, 2382–2392.

Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* (2000) 407, 233-41.

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* (2003) 2, 638-45.

Matsuzaka T, Shimano H, Yahagi N, Yoshikawa T, Amemiya-Kudo M, Hasty AH, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Osuga J, Takahashi A, Yato S, Sone H, Ishibashi S, Yamada N. Cloning and characterization of a mammalian fatty acyl-CoA elongase as a lipogenic enzyme regulated by SREBPs. *J. Lipid Res* (2002) 43, 911-20.

Merrill AH Jr. De novo sphingolipid biosynthesis: a necessary, but dangerous, pathway. *J Biol Chem* (2002) 277, 25843-6.

Michel C.I., Schaffer J.E. As a Matter of Fat. *Cell Metabolism* (2009) 10, 9-12.

Miller D.M., Olson J.S., Pflugrath J.W., Quiococho F.A. Rates of ligand binding to periplasmic proteins involved in bacterial transport and chemotaxis. *The Journal of Biological Chemistry* (1983) 258, 13665-72.

Mlícková K, Roux E, Athenstaedt K, d'Andrea S, Daum G, Chardot T, Nicaud JM. Lipid accumulation, lipid body formation, and acyl coenzyme A oxidases of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl Environ Microbiol* (2004) 70, 3918-24.

Morley S, Cecchini M, Zhang W, Virgulti A, Noy N, Atkinson J, Manor D. Mechanisms of ligand transfer by the hepatic tocopherol transfer protein. *J Biol Chem* (2008) 283, 17797-804.

Mukherjee S., Maxfield F.R., Lipid and cholesterol trafficking in NPC. *Biochimica et Biophysica Acta* (2004) 1685, 28-37.

Muñoz V., Serrano L. Elucidating the folding problem of helical peptides using empirical parameters. *Nat Struct Biol* (1994) 1, 399-409.

Murzin AG, Brenner SE, Hubbard T, Chothia C. SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J Mol Biol* (1995) 247, 536–540.

Niki. Near-stoichiometric interaction between the non-specific lipid-transfer protein of the yeast *Candida tropicalis* and peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase prevents the thermal denaturation of the enzyme in vitro. *Yeast* (1994) 10, 1467-76.

Ohba T, Rennert H, Pfeifer SM, He Z, Yamamoto R, Holt JA, Billheimer JT, Strauss JF 3rd. The structure of the human sterol carrier protein X/sterol carrier protein 2 gene (SCP2). *Genomics* (1994) 24, 370-4.

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* (1995) 34, 10660-8.

Olofsson S.O., Bostrom P., Andersson L., Rutberg M., Perman J., Boren J. Lipid droplets as dynamic organelles connecting storage and efflux of lipids. *Biochimica et Biophysica Acta* (2009) 1791, 448-58.

Press W.H., Teukolsky S.A., Vetterling W.T., Flannery B.P. *The art of scientific computing* (1992).

Raul G. Ferreyra, Noelia I. Burgardt, Daniel Milikowski, Gustavo Melen, Alberto R. Kornblihtt, Esteban C. Dell 'Angelica, Jose A. Santome, Mario R. Ermacora. A yeast sterol carrier protein with fatty-acid and fatty-acyl-CoA binding activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* (2006) 453, 97-206.

Requena N., Fuller 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* (1999) 12, 934-42.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning* (1989).

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* (1995) 34, 11919-27.

Schaaf G, Ortlund EA, Tyeryar KR, Mousley CJ, Ile KE, Garrett TA, Ren J, Woolls MJ, Raetz CR, Redinbo MR, Bankaitis VA. Functional anatomy of phospholipid binding and regulation of phosphoinositide homeostasis by proteins of the sec14 superfamily. *Mol Cell* (2008) 29, 191-206.

Schägger 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* (1997) 166, 368-79.

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* (1998) 225, 23-9.

Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* (2000) 106, 171-6.

Shureiqi I, Lippman SM. Lipoygenase modulation to reverse carcinogenesis. *Cancer Res* (2001) 61, 6307-12.

Sklar L.A., Hudson B.S., Simoni R.D. Conjugated polyene fatty acids as fluorescent probes: binding to bovine serum albumin. *Biochemistry* (1977) 16, 5100-08.

Stanley W.A., Filipp F.V., Kursula P., Schuller 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* (2006) 24, 653-63.

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* (2002) 59, 193-212.

Storch J, Corsico B. The emerging functions and mechanisms of mammalian fatty acid-binding proteins. *Annu Rev Nutr* (2008) 28, 73-95.

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* (1989) 75, 119-26.

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* (1994) 10, 1065-74.

Uversky V.N. Use of fast protein size-exclusion liquid chromatography to study the unfolding of proteins which denature through the molten globule. *Biochemistry* (1993) 32, 13288-98.

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* (1994) 33, 2782-91.

Wang Z.X. An exact mathematical expression for describing competitive binding of two different ligands to a protein molecule. *FEBS Letters* (1995) 360, 111-4.

Zheng BS, Rönnberg E, Viitanen L, Salminen TA, Lundgren K, Moritz T, Edqvist J. Arabidopsis sterol carrier protein-2 is required for normal development of seeds and seedlings. *J Exp Bot* (2008) 59, 3485-99.

Zinjarde S.S., Pant A. Emulsifier from a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. *Journal of Basic Microbiology* (2002) 42, 67-73.

Zucker RM, Hunter ES 3rd, Rogers JM. Confocal laser scanning microscopy of morphology and apoptosis in organogenesis-stage mouse embryos. *Methods Mol Biol* (2000) 135, 191-202.



LOS LEPPSONS



Ale 'perro loco'
Saaaaancho



Gabi 'rulo' Torchhh

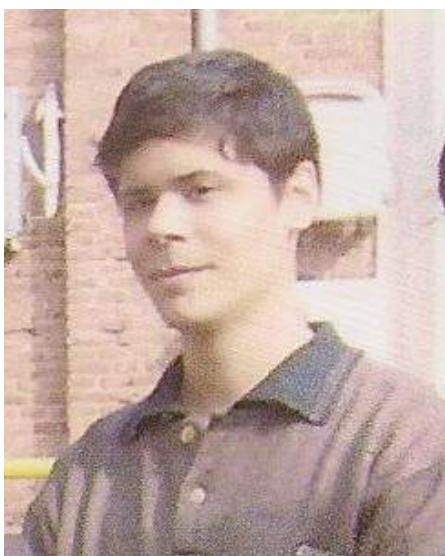




‘Mamá’ Noel Burgardt



‘che’ Mauricio Sica



Martín
‘el destornillador’
Noguera





¡YO!



¡EL INCRÍBLE
RAHÚLK!



Yyyyy.....¡EL JEFE!



¡EL SUPER JEFE!



Y EL JEFE (*paper* en mano) ¡a punto de llegar a una brillante conclusión!



