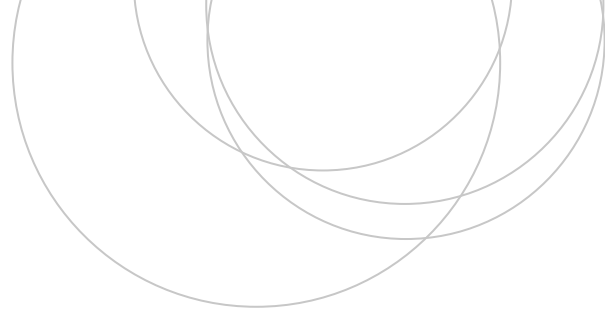




Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

ZIENTZIA
ETA TEKNOLOGIA
FAKULTATEA
FACULTAD
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Gradu Amaierako Lana
Biokimika eta Biologia Molekularreko gradua Gradua

LDL hartzailearen p.(Asp679Gly) aldaeraren karakterizazio funtzional eta sailkapena

Egilea:
Joseba Aguiló Arce
Zuzendaria
César Martín Plágaro

© 2019, JOSEBA AGUILÓ ARCE

AURKIBIDEA

1. SARRERA ETA HELBURUAK.....	1
2. MATERIAL ETA METODOAK.....	3
2.1. <i>In silico</i> analisia	
2.2. Zelula eukariotoen hazkuntza	
2.3. Lipofektamina bidezko transfekzioa	
2.4. Western plapaketa bidezko analisia	
2.5. LDL purifikazioa eta FITC bidezko markaketa	
2.6. LDLR-ren aktibitatearen karakterizazioa fluxu zitometria bidez	
2.6.1. LDLR adierazpena	
2.6.2. LDLR-LDL lotura tasa	
2.6.3. LDL barneraketa-tasa	
2.7. Mikroskopia konfokala	
3. EMAITZAK.....	7
3.1. <i>In silico</i> analisi bidez determinatutako LDLR aldaeraren patogenizitatea	
3.2. p.(Asp679Gly) aldaeraren adierazpena CHO-ldl Δ 7 zeluletan	
3.3. p.(Asp679Gly) aldaeraren fluxu zitometria bidezko funtzionaltasun analisia	
3.4. pH desberdinetara LDL partikulak lotzeko hartzaile mutatuaren gaitasunaren analisia	
3.5. p.(Asp679Gly) aldaeraren zelula-barneko kokapena eta mutazioaren sailkapena	
4. EZTABAIDA.....	10
5. ONDORIOAK.....	12
6. ERREFERENTZIAK.....	12

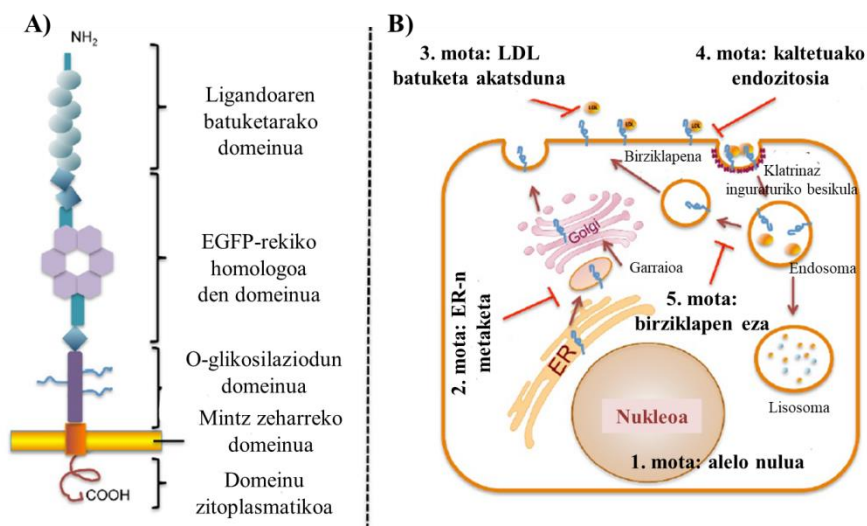
1. Sarrera eta helburuak

Hiperkolesterolemia familiarra (HF) gaixotasun heredagarri autosomiko dominantea da, zeina batez ere dentsitate baxuko lipoproteinen kolesterol (LDL-C) maila altuengatik karakterizatzen den, hauen katabolismo murriztuagatik¹. Tratatu ezean, LDL-C maila altuek plaka aterosklerotikoaren garapena eta gaixotasun kardiobaskular goiztiarrerako (CDV) arriskua areagotzen dute². HF-ren eragile nagusiak batez ere LDL hartzailleak dira (LDLR), apoB100, PCSK9 eta LDLRAP1 proteinez gain.

Esan bezala, LDLR genea HFren garapenaren arduradunetarikoa bat da³ plasmatik LDL partikulak harrapatzen baititu eta beraz, hartzaillearen funtzionamendu desegokia lipoproteina hauen maila altuekin erlazionatu ohi da.

LDLR heldua ugaztun zeluletan kolesterolaren homeostasia erregulatzen duen 839 amino azidodun I motako transmintz proteina da¹. 19. kromosomako beso laburraren 19p13.1-13.3 eskualdean dago kodetuta eta bost domeinu desberdinetara transkribatu eta itzultzen diren 18 exoi eta 17 introiez osatutako 45 kb-ko sekuentzia da⁴. Proteina 860 amino azidodun prekurtsore moduan kodetuta dago, N-muturrean 21 hondarreko sekuentzia seinale bat duelarik, erretikulu endoplasmatikora (EE) translokatzeari mozten dena⁵. EE-ko erribosometan sintetizatzen da, bertan tolestu eta partzialki glikosilatu eta azkenik Golgi aparatuan heltzen da, non glikosilazioa amaitzen den⁶. Proteina heldua domeinu funtzionaletan egituratzen da, ektodomeinu eta zelula barneko domeinuetan antolatuta (1A irudia).

Ektodomeinuko N-muturrean jarraian dauden zazpi A motako LDLR moduluek lipoproteinak batzen dituzte; hauetan zisteinetan aberatsak diren errepikapenak daude eta bertako hondar azidoek Ca^{2+} ioiak koordinatzen dituzte, domeinuaren tolespenerako beharrezkoak direnak⁷. Ligandoaren batuketarako errepikapen hauen ostean, hazkuntza faktore epidermikoaren prekurtsorearekiko (EGFP) homologoa den eskualdea dago, zeina bi hazkuntza faktore epidermikoaren (EGF-A eta EGF-B) antzeko moduluz, sei paladun β -propultsore itxurako egitura (ingeleseko *β -propeller*) osatzen duten sei YWTD errepikapenez eta hirugarren EGF modulu batez (EGF-C) osatuta dagoen; hartzaillearen egituraren zati hau lotutako lipoproteinen askapenarekin erlazionatuta dago pH baxuetan^{8,9}. EGFP eta mintzaren artean serina eta treoninetan aberatsa den eta O-glikosilazioa pairatzen duen eskualde bat dago, zeina hartzaillearen egonkortasunean parte hartzen duela uste den¹⁰.



1. Irudia. LDL hartzailaren domeinuen antolaketa (A) eta honen bidezidor eta erregulazioan eragina duten mutazio motak (B). LDLR erretikulu endoplasmatikoa sintetizatzen da eta Golgi aparatua garraiatu bertan prozesatu eta glikosilatzeko; hartzaille heldua mintz plasmatikora garraiatzen da, non LDL partikulen ApoB-100 lotuko duen; behin LDLR-LDL konplexua eratuta, hau endozitatu eta LDL partikulak lisosometan degradatzen diren bitartean, hartzaillea birziklatu egiten da, berriro ere mintzera bueltatuz. LDLR-ko edozein mutazioek zikloaren erregulazioa oztopatu dezake. (Benito-Vicente, A. *et al.* (2018) artikulutik agokituta)¹¹

Zelula barneko domeinuen mintz zeharreko domeinua osatzen dute. Honek hartzaillea mintzera ainguratzeko beharrezkoak diren 22 aminoazido hidrofobiko ditu. Domeinu zitoplasmatikoa, ordea, 50 hondarez osatuta dago, LDLR-a mintzera eta gaineztatutako besikuletara bidertzen duten bi seinale sekuentzia ditu¹² eta hartzailaren barneraketarako beharrezkoa da^{13,14}.

LDLR-aren zikloari dagokionez, behin lipoproteina hartzailera batuta, konplexua klatrinaz gaineztatutako besikulen bidez barneratzen da¹⁵, zeintzuetan, endosoma goiztiarrekin batzean emandako pH-aren azidifikazioaren ondorioz, LDL partikulen askapena ematen den (1B irudia). Lipoproteinak gero lisosometan degradatzen dira eta hartzaillea mintzera bueltatu eta ziklo berri bat hasten da⁷.

Sistema honek LDL-etatik lortutako kolesterol eta sintetizatutako kolesterolaren ratioak kontrolatuz hepatozito eta beste zelulen kolesterol mailak konstante mantentzen ditu¹⁶. Modu honetan, LDL hartzailan emandako mutazioek honen zikloan eragina dute, HF eragin dezaketelarik, eta proteina mutantearen portaera fenotipikoaren arabera sailkatzen dira (1B irudia)^{17,18}: 1 motako mutazioek sintesian eragina dute, alelo nulu moduan ezagutzen direlarik; 2 motakoek, ordea, bai Golgi aparatua baita mintzerako garraio akatsak suposatzen dituzte, proteinaren hiru dimentsioetako egitura apropos ezan oinarritzen direlarik, ER-an partzialki zein guztiz harrapatuta mantenduz (2B eta 2A, hurrenez hurren); 3 motakoek LDL batuketan eragiten

dute, normalaren % 2-30 lotuz, zisteina errepikapenetan emandako berrantolaketa edo EGFP domeinuan emandako delezioengatik; 4 motako mutazioek endozitosi akastuna suposatzen dute, LDLR-ak klatrinaz inguratutako besikuletan biltzen ez baitira; 5 motako mutazioek, azkenik, hartzaileren degradazioa lisosometan suposatzen duen LDL askapen ezak abiarazitako birziklapen mekanismoaren asaldura eragiten dute. Berriki deskribatu izan den seigarren mutazio mota batek LDLR-aren txertaketa mintzean eragozten du, hartzaileren jariapena sustatuz¹⁹.

Beraz, eta aurreko guztia kontuan hartuz, lan honen helburua LDL hartzaileren p.(Asp679Gly) mutazioaren karakterizazio funtzionala burutzea izan da, honetarako zenbait teknika immunohistokimiko eta konputazional erabili direlarik.

2. Material eta Metodoak

2.1. *In silico* analisia

Proteina aldaera ezberdienen efektua sarrera libreko *software* bitartez aurreikusi da, honetarako PolyPhen-2 [20], Sorting Tolerant From Intolerant (SIFT) [21], Grantham Score [22] eta Align GVGD (<http://agvgd.hci.utah.edu/>) sofwareak erabili direlarik. Polyphen softwareak 3 kategoria ezberdinetan banatzen ditu aldaerak, “seguraski kaltegarria”, “agian kaltegarria” edo “onbera”. SIFT programak, ordea, aminoazido aldaketak “hilgarri” edo “jasangarri” bezala sailkatzen ditu kaltegarriak edo efektu gabekoak diren arabera. Grantham programak aldaera bakoitzari balio bat ematen dio kontserbakorra (0-50), nahiko kontserbakorra (50-100), nahiko erradikala (100-150) edo erradikala (≥ 150) den arabera. Align GVGD-k, azkenik, balio desberdinak ezartzen dizkio, zeintzuek C0 (ez patogenikoa) eta C65 (patogenikoa) bitartean dauden.

2.2. Zelula eukariotoen hazkuntza

CHO-*ldl* Δ 7 hamster obulutegietatik isolatutako fibroblasto lerro zelularra da. Zelula hauen berezitasun nabarmenena LDLR kodetzeko ezintasuna da eta ondorioz LDLR aldaeren karakterizazio funtzionala egiteko zelula oso aproposak dira. Zelulak Ham's-F12 medioan (Nutirent mixture F-12 HAM, Sigma-Aldrich, EEBB) hazi dira eta honi inaktibatutako % 5 (b/b) FBS (behi-serum fetala, Lonza, Belgika), 100 U/mL penicilina eta 100 μ g/mL estreptomizina gehitu zaizkio. Zelula hauek 37 °C-tan eta % 5-ko CO₂-dun atmosferan hazi dira.

2.3. Lipofektamina bidezko transfekzioa

Lipofektamina (Invitrogen, EEBB) transfekzio teknikak positiboki kargatutako liposometan oinarrituta daude. Hauek, negatiboki kargatutako zelula mintzekin efizientzia handiz elkarrekiten dute eta endozitosi bidez barneratzen dira. Zelulak % 50-eko baterakuntzara ailegaten direnean Opti-MEM (Invitrogen, EEBB) medioan diluitzen dira. 24 orduren ostean Lipofektamina-DNA nahasketak prestatzen dira: 25 µL Opti-MEM + 1 µg DNA (Mix 1) eta 25 µL Opti-MEM + 1 µL Lipofektamina (Mix 2) eta zelula medioei gehitzen zaizkie (25 µL Mix bakoitzetik 500 µL Opti-MEM-dun putzu bakoitzeko). 6 orduren ostean Opti-MEM medio honi % 5 FBS gehitzen zaio zelulen biziraupen tasa hobetzeko eta 48 orduz uzten dira inkubatzen adierazpen maila maximoa lortu arte.

2.4. Western plapaketa bidezko analisia

Transfektatu eta 48 ordu pasa ondoren, zelulen medioa kendu eta 300 µL liseriketa medioaz (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 125 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 5,4 mM NaF, 1,5 mM NaP, 1 mM orthovanadate, 1 mg/mL protease inhibitor cocktail (Roche) eta 0,25 mg/mL Pefabloc, 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF; Roche)) ordezkatu da. Liseritutako zelula jalkinak Western plapaketa bidezko analisi semi-kuantitatibo bat burutzeko prestatu dira. Horretarako proteinen kontzentrazioa neurtu da eta pisu molekularren arabera sodio dodezil sulfatozko poliakrilamidazko elektroforesi gelak erabiliz (SDS-PAGE) banatu dira. Nitrozuluzasko mintzak ordubetez inkubatu dira blokeo soluzioan (TBST 2 mM CaCl₂ + % 5 esne gaingabetua) lotura inespezifikoak ekiditeko eta ondoren, antigorputz primarioekin inkubatu dira 16 orduz 4°C-tan (untxi anti-LDLR antigorputz poliklonala 1:1000 (Cayman)). Hiru TBST 2 mM CaCl₂ garbiketa egin ostean, mintza HRP (ingelesetik, *horseradish peroxidase*) konjugatutako antigorputz sekundarioarekin (HRP-lotutako anti-untxi IgG 1:2000 (Cell Signaling)) ordu batez giro tenperaturan inkubatu dira. Proteinen detekziorako, mintza LuminataTM Forte Western plapaketarako errektibo kimioluminiszentearekin (Millipore Corporation, Billerica, EEBB) inkubatu da eta bistaratzea ChemiDoc XRS-a (Bio-Rad, Hercules, CA, EEBB) erabiliz burutu da.

2.5. LDL purifikazioa eta FITC bidezko markaketa

Odol serumetik LDL-ak beste proteinetatik banatzeko KBr erabiliz bi faseko gradiente bat sortzen da. Beheko fasean seruma jartzen da (KBr gehituko zaio 1,21 g/mL dentsitatera heldu arte) eta goiko fasean PBS indargetzailea. Laginak 27.000 rpm-ko abiaduran zentrifugatzen dira 22 orduz eta 4 °C-tan. Bukatzeko LDL-ei dagokien bandak berreskuratzen dira. Hauek FITC

fluoroforoa (ingelesetik *fluorescein isothiocyanate*) erabiliz markatu dira aurretiaz deskribatutako metodologia jarraituz²³. Laburki, 0,1 M Na₂HPO₄ pH= 9 indargetzailean dagoen LDL mL bakoitzeko (1 mg/mL) 10 µL FITC (1,8 mg/mL, dimetil sulfoxidoan disolbatua) nahastu zaizkio. Nahastea 2 orduz irabiatu da giro tenperaturan. Lotu ez den fluoroforo soberakina kentzeko LDL-ak PBS-an orekatutako Sephadex G25 gel iragazpen zutabe batetik pasatu dira (PD-10 desalting column, GE, EEBB). Lagin guztien proteina kontzentrazioa Pierce BCA proteina neurketa metodoa erabiliz (Pierce BCA protein assay, Pierce) neurtu dira behi serumaren albumina (BSA, ingelesetik, *Bovine Serum Albumin*) estandar moduan erabiliz.

2.6. LDLR-ren aktibitatearen karakterizazioa fluxu zitometria bidez

Fluxu-zitometria zelulen analisirako parametro anitzeko teknika da. Bertan, aztertu behar diren partikulen esekidura (gehienetan zelulak) banan banan alienatuta laser batetik pasarazten dira. Laserrak zelulekin talka egitean informazioa ematen duten seinale desberdinak igortzen ditu, argiaren dispersioarengatik eta fluoreszentsia igorpenarengatik. Hauetatik zelula bakoitzaren tamaina, konplexutasuna eta markaketarako erabilitako fluorokromoaren fluoreszentsiaren inguruko informazioa eskuratu daiteke.

2.6.1. LDLR adierazpena

Tratamendua bukatutakoan, zelulak 3 aldiz garbitu dira PBS % 1-BSA indargetzailearekin, 10 minutuz fixatu dira % 4 paraformaldehidoan, berriro garbitu eta ordu batez blokeatzen jarri dira giro tenperaturan % 5 FBS-dun garbiketa tampoian. Hartzailaren detekziorako LDLR-ren aurkako antigorputzarekin (1:1000; 5 mg/L; Progen Biotechnik GmbH) inkubatu dira ordu batez giro tenperaturan. Hurrengo pausuan 3 garbiketa berri egin dira eta arratoiaren aurkako Alexa Fluor 488 fluoroforoarekin konjugatutako antigorputz sekundarioarekin (1:2000; Molecular Probes) inkubatu dira, ordu batez, giro tenperaturan. Behin zelulak altxatuta, laginak zitometrotik pasarazi dira.

2.6.2. LDLR-LDL lotura-tasa

Esperimentuetan erabilitako zelulak 2 orduz inkubatu dira 4 °C-tan LDLR eta LDL-FITC partikulen arteko lotura-tasa zehazteko. LDL-FITC inkubazioaren ostean zelulak hiru aldiz garbitu dira PBS % 1-BSA indargetzailea erabiliz, 10 minutuz % 4 paraformaldehidoarekin fixatu eta berriro garbitu dira PBS % 1-BSA indargetzailean, ondoren zelulak altxatu eta zitometroaren bidez analizatzeko.

Modu berean, mutazioaren sailkapena bermatzeko, lotura saio desberdin bat burutu da, honen tasa pH desberdinetan aztertuz. Honetarako, pH desberdinetako 5 medio prestatu dira (pH 5,5, 6, 6,5, 7 eta 7,5), 0,4 M sakaroadun Ham's-F12 medioaren azidotasuna kasu bakoitzean doitu. Aurretik 48 orduz Opti-MEM medioan hazitako zelula transfektatuei medioa kendu, prestatutakoen 500 μ L gehitu eta 5 minutuz inkubatu dira giro tenperaturan. Denbora igarota, liporproteina markatuak gehitu dira 20 μ g/mL-ko kontzentrazioa lortu arte. 30 minutuz 4 °C-tan inkubatu ostean, medioa kendu, PBS 5 mM EDTA 300 μ L gehitu eta laginak zitometroan analizatu dira.

2.6.3. LDL barneraketa-tasa

Esperimentuan erabilitako zelulak 4 orduz inkubatu dira 37 °C-tan LDL-FITC partikulen barneraketa-tasa zehazteko. LDL-FITC inkubazioaren ostean zelulak hiru aldiz garbitu dira PBS % 1-BSA indargetzailea erabiliz; barneratutako partikulen seinalea neurtzeko eta kanpoan lotuta geratu diren partikulek igortzen dutenetik bereizteko, 1:1 ratioan PBS 5 mM EDTA eta Trypan blue disoluzioa (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) erabili dira, % 0,2 bukaera kontzentrazioan. Azken konposatu honek, FITC-aren seinalea iraungipen dinamiko bidez deuseztatze gaitasuna dauka beti ere molekula fluoreszentearekin elkarrekintza fisiko bat badu. Hori dela eta, kanpotik botaz gero, kanpoan dagoen FITC-a iraungitu ahal izango du eta ondorioz, barneratutako FITC seinalea detektatuko den seinale bakarra izango da.

2.7. Mikroskopia konfokala

Mikroskopia konfokala LDL eta LDLR proteinen barne kokapena eta haien arteko elkarrekintzak ikusteko erabili da. Horretarako, zelula ezberdinak beirazko estalkien gainean 24 putzuko plaketan hazi dira. Transfektatu ostean, liporproteina markatuekin egindako 3 orduko inkubazioaren azken orduan lisosomaren markatzailea den LysoTracker™ Red (ThermoFisher Scientific) gehitu zaie zelulei 1 μ M-eko amaierako kontzentrazioan. Behin denbora igarota, zelulak PBS % 1-BSA indargetzailearekin garbitu dira 3 aldiz, ondoren 10 minutuz fixatzeko % 4 paraformaldehido soluzioan. Proteinen barne kokalekua ikuskatzeko, zelulak % 0,1 Triton X-100 detergentearekin zulatu dira. Triton X-100 edo % 4 paraformaldehido soberakinak kentzeko 3 garbiketa berri egin dira PBS % 1-BSA soluzio indargetzailearekin. Antigorputz ezberdinen inkubazioekin hasi baino lehen zelulak % 5 FBS-dun garbiketa tanpoian inkubatu dira ordu batez giro tenperaturan lotura inespezifikoak ekiditeko. Proteina ezberdinak markatzeko, zelulak bi orduz utzi dira antigorputz primarioarekin 1:100 diluzioan (sagu anti-LDLR antigorputz monoklonala (Progen Biotechnik)). Horren ostean, antigorputz sekundario ezberdinekin (sagu

Alexa Fluor 647 antigorputza (Life technologies)) inkubatu dira ordu batez giro tenperaturan proteina ezberdinak detektatu ahal izateko. Azkenik, zelulak DAPI-rekin (Merck, 268298) 10 minutuz inkubatu dira zelulen nukleoak bereizteko. Irudiak Olympus IX 81 mikroskopia konfokala (Olympus, Japonia) erabiliz lortu eta Fiji softwarearekin aztertu dira.

3. Emaitzak

3.1. *In silico* analisi bidez determinatutako LDLR aldaeraren patogenizitatea

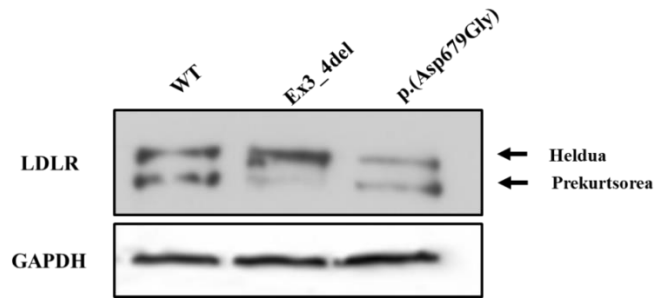
Software desberdinekin lortutako emaitzak 1. taulan agertzen dira. Hain zuzen ere, p.(Asp679Gly) aldaerak hartzailearen EGF-C eskualdeko azido aspartikoaren aldaketa eragiten du glizinagatik (proteina helduaren 679. posizioan dagoena), moztitsaketa araeuan aldaketarik sumatzen ez delarik. Hala ere, erabilitako programa informatikoak ez datoz bat mutazioaren kaltegarritasunean; izan ere, Polyphen bidez lortutako emaitzen arabera segur aski kaltegarria izan arren, beste softwareekin lortutakoek mutazioa patogenikoa ez dela aurreikusten dute (material eta metodoen 2.1 atalean azaldutako puntuazioetan oinarrituta). Desadostasun honek lanaren helburua den karakterizazio funtzionalaren garrantzia berresten dute.

1. Taula. Programa informatikoen bidez lortutako LDLR aldaeraren patogenizitate emaitzak.

ALDAERA				IN SILICO ANALISIA						
DNA osagarria	Proteina heldua	Mutazio mota	Kokalekua proteinan	Nt kontserbazioa	Aa kontserbazioa	Moztitsaketa aurreikuspena	Grantham puntuazioa	GVDG	SIFT	Polyphen-2
c.2099A>G	p.Asp679Gly	Aa aldaketa	EGF-C	10/10	9/10	Desberdintasunik ez	94	C0	Jasangarria	Segur aski kaltegarria

3.2. p.(Asp679Gly) aldaeraren adierazpena CHO-*ldl* Δ 7 zeluletan

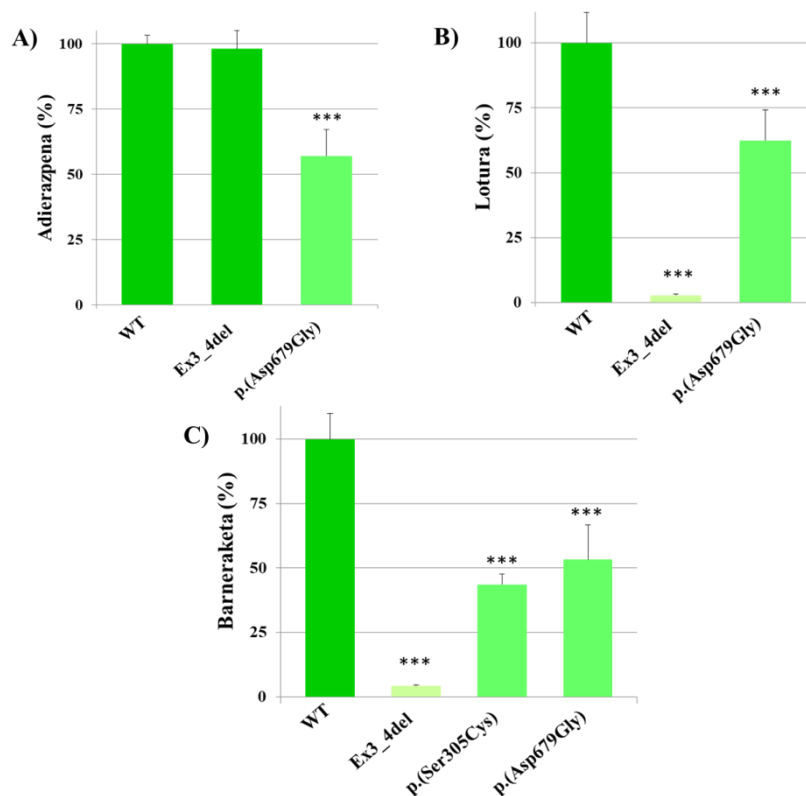
LDLR aldaeraren adierazpena Western plapaketa bidez aztertu zen. LDLR basatiak 160 kDa inguruan LDLR helduari dagokion banda bat eta glikosilatu gabeko prekurtsoreari dagokion beste bat ageri zuen, (2. irudiko lehen kalea). p.(Asp679Gly) aldaeraren kasuan ere bi banda detektatu ziren, baina kasu honetan intentsitate baxuagoarekin (2. irudiko 3. kalea). Erabilitako kontrol positiboak batez ere proteina helduari dagokion banda erakutsi zuen (2. irudiko 2. kalea). Geleko kale desberdinek proteina karga berdina zutela frogatzeko GAPDH proteina konstitutiboaren aurkako antigorputza erabili zen. Beraz, nahiz eta hartzaile kantitate gutxiago aurkeztu, p.(Asp679Gly) aldaerak basatiaren antzeko adierazpen patroia duela antzeman daiteke.



2. Irudia. p.(Asp679Gly) aldaerak hartzaillearen adierazpen maila baxuagoa aurkezten du. LDLR aldaeren adierazpen analisia material eta metodoetan azaldutako Western plapaketa bidez.

3.3. p.(Asp679Gly) aldaeraren fluxu zitometria bidezko funtzionaltasun analisia

Aurreko adierazpen saioko emaitzekin bat etorritz, p.(Asp679Gly) aldaerak, LDLR basatiarenarekin alderatuz, adierazpen maila txikiagoa aurkeztu zuen fluxu zitometria bidez aztertzean ere (wt: 100±3; Ex3_4del: 98±7; p.(Asp679Gly): 57±10) (3A irudia).

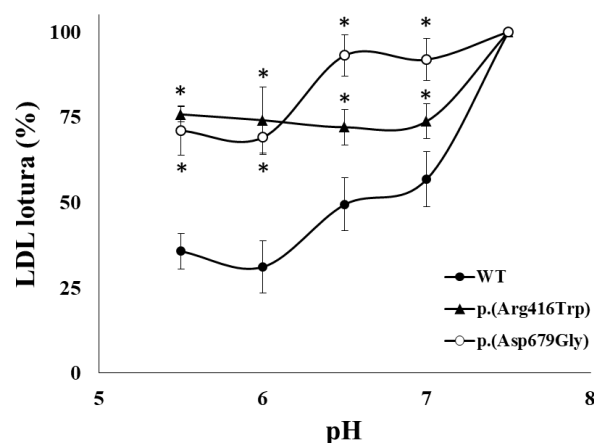


3. Irudia. p.(Asp679Gly) aldaerak % 50-eko LDLR adierazpen eta LDL-FITC-aren lotura eta barneraketa mailak aurkezten ditu. A) LDL hartzaillearen adierazpena mintzean. B) Aldaera desberdindun hartzaille-lipoproteina lotura, ehunekotan adierazita. C) LDL barneraketa ehunekotan. Saio guztien emaitzak esperimendu desberdinen batz besteko moduan adierazi dira ± desbiderapen estandarra. Adierazgarritasun estatistikoa Student t-testa erabiliz zehaztu da (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,025$; *** $p \leq 0,01$).

LDL eta hartzaile mutatuaren arteko batura-mailari dagokionez, adierazpen entseguan lortutako antzeko emaitzak ikusi ziren (wt: 100 ± 11 ; Ex3_4del: 3 ± 1 ; p.(Asp679Gly): 62 ± 12 ; $P < 0.01$) (3B irudia). 3C irudian, azkenik, aztergai den aldaeraren LDL barneraketa datuak ageri dira beste aldaerarekin konparatuta (wt: 100 ± 10 ; Ex3_4del: 4 ± 0 ; p.(Ser305Cys): 44 ± 4 ; p.(Asp679Gly): 53 ± 13 ; $P < 0.01$). Lotura eta barneraketa saioetan barne kontrol negatibo bezala Ex3_4del aldaera erabili zen LDL lotzeko gaitasunik ez duelako, eta beraz, ezta barneratzeko ere; modu berean, %50-eko barneraketa tasa jakina duen 3 motako p.(Ser305Cys) aldaera ere erabili zen kontrol gisa. Lortutako emaitzak ikusita, esan daiteke p.(Asp679Gly) aldaerak LDLR-ren aktibitatea partzialki murrizten duela, % 50 hain zuzen ere.

3.4. pH desberdinetara LDL partikulak lotzeko hartzaile mutatuaren gaitasunaren analisia

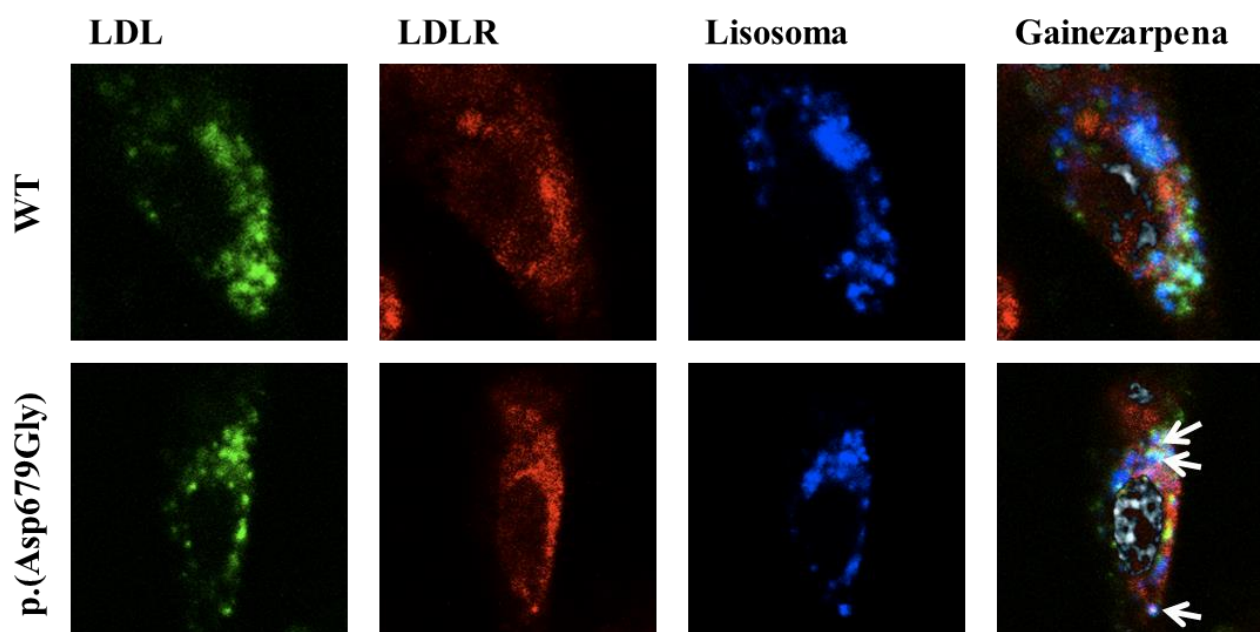
p.(Asp679Gly) aldaeraren lipoproteinak askatzeko mekanismoa karakterizatzeko, pH desberdinetan lotutako LDL kopurua kuantifikatu zen fluxu zitometria bidez, endosometan emandako azidifikazioa simulatzeko. 4. irudian aurkezten den moduan, pH jaitsierak LDL-ren askapenean zuen eragina LDLR basatian zein p.(Asp679Gly) aldaeran desberdina zela antzeman daiteke. Basatiaren kasuan, pH 5,5-ean duen LDL lotua, pH 7,5-ean zuenaren herena zen; aldaerarenean, ordea, pH jaitsierak eragin nabarmenik ez zuela dirudi, birziklapen akastunaren kontrol positiboa den p.(Arg416Trp) aldaeraren balio minimo berdintsuetara jaitsi zelarik (%75 inguru); hots, aldaeraren kasuan, hartzaile eta lipoproteina markatuen arteko lotura ez da pH-arekiko sentikorra.



4. Irudia. pH-aren jaitsierak ez du LDL askapen esangarririk eragiten p.(Asp679Gly) aldaerarekin transfektatutako zeluletan. Hartzailearen birziklapenaren azterketa pH desberdindun Ham's-F12 medioan emandako LDL-LDLR arteko elkarrekintzak neurtuz. Emaitzak errepikapenen batz besteko moduan adierazi dira \pm desbiderapen estandarra. Adierazgarritasun estatistikoa Student t-testa erabiliz zehaztu da (* $p \leq 0,01$).

3.5 . p.(Asp679Gly) aldaeraren zelula-barneko kokapena eta mutazioaren sailkapena

Fluxu zitometriaz lortutako emaitzen arabera, p.(Asp679Gly) aldaera pH-rekiko sentikorra ez dela dirudi, birziklapen arazo bat suposatuko lukena (5 mota). Hau frogatzeko LDLR eta lisosomaren arteko kolokalizazioa ikustarazi zen. 5. irudian azaltzen den moduan, basatiaren kasuan LDL-lisosoma kolokalizazioa antzeman zen (urdin argia), baina ez hartzaile eta organuluaren artekoa; p.(Asp679Gly) aldaerak, ordea, pH desberdinetara burututako saioan lortutako emaitzetan oinarrituz espero zen bezala, lisosomarekin kolokalizazio partziala aurkeztu zuen eta ondorioz 5 motakoekin sailkatu daiteke.



5. Irudia. p.(Asp679Gly) aldaeradun hartzaileak lisosomarekin kolokalizatzen du. Basatian hartzaile eta lisosomaren arteko kolokalizaziorik antzematen ez zen bitartean, p.(Asp679Gly) aldaeraren kasuan LDLR eta organuluaren arteko zenbait kolokalizazio puntu behatu ziren (gezi zuriak). Irudi bakoitzak baldintza horretarako zelula adierazgarri bat erakusten du.

4. Eztabaida

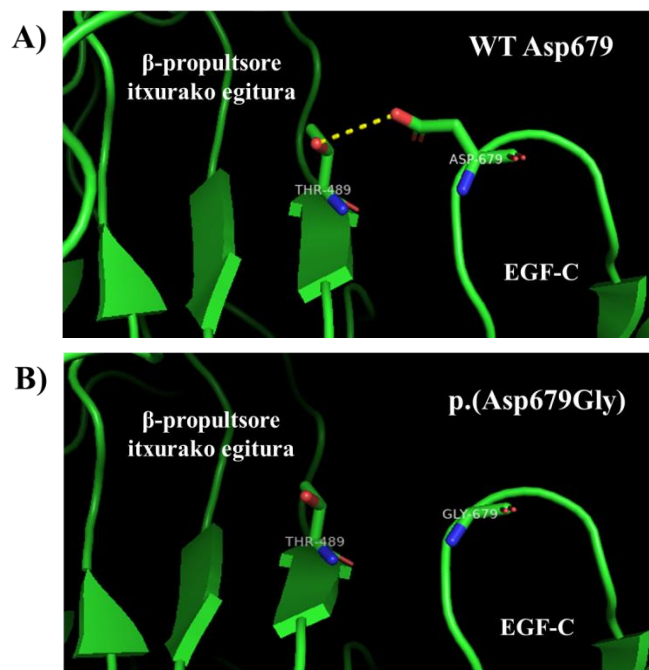
Hiperkolesterolemia familiarra batez ere LDL hartzailean emandako mutazioengatik eraginda dago, honen funtzionamendu okerra edo eza eragiten dutelarik². Modu honetan, kolesterolan aberatsak diren LDL partikulen bahiketa odoletik murrizten denez, plaka ateroklerotikoaren garapena eta gaixotasun kardiobaskular goiztiarrerako arriskua areagotzen da. LDLR-ren konformazioa hartzailearen funtzionamendurako ezinbestekoa da, eta hortaz, tolespena prozesu oso garrantzitsu eta hainbat faktoreren menpekoa da, haien artean proteinak dituen disulfuro

zubiak, β -propultsore itxurako egituraren tolespena eta kaltzioaren beharra⁸. Ugaztun zeluletan hau ER-n gertatzen da txaperona espezializatuen laguntzaz²⁴.

Nahiz eta HF-ren eragile diren LDLR aldaera ugari identifikatu diren, gehiengoa ez da sailkatu edo funtzionalki karakterizatu, ezinbestekoa dena diagnostiko genetiko eraginkor bat egiteko. Horregatik lan honetan espainiar populazioan ugarienetarikoa den LDLR-aren EGF-C domeinuan kokatutako p.(Asp679Gly) aldaera analizatu eta sailkatu da.

Fluxu zitometria bidez lortutako emaitzetan oinarrituz, aldaera patogenikoa dela esan daiteke, bai LDLR adierazpen mailak baita LDL lotura eta barneraketarenak ere ia erdira murrizten direlako (3. irudia). Sailkapena determinatzeko burututako pH desberdinetako saiuetan lortutako emaitzek (4. irudia) p.(Asp679Gly) aldaera 5 motakoa dela iradokitzen dute; hau baieztatzeko asmoz, mikroskopia konfokal bidez LDLR eta lisosomaren kolokalizazioa aztertu zen (5. irudia), emaitza positiboak lortuz. Aldaera mota honek LDL askapen akastuna suposatzen du endosometan, hartzaila birziklatu beharrean lisosometan lipoproteinarekin batera andeatzen delarik^{17,18}. Modu honetan, jakina da baldintza normaletan lipoproteinen askapena eragin eta p.(Asp679Gly) bezalako 5 motako aldaerek oztopatu dezaketen mekanismoa; honen arabera, endosometako pH azidoan LDL hartzailak konformazio aldaketa bat pairatzen du, ligandoaren batuketarako domeinua EGFP-rekiko homologoa den domeinuko β -propultsore itxurako egiturarentz tolestuz, eta modu honetan LDL partikula askatzen da⁷. Elkarrekintza honetan LR5 errepikapena ezinbestekoa dela ikusi da, zeinaren egonkortasuna eta Ca^{2+} -rekiko afinitatea nabarmenki murrizten den pH azidoetan²⁵.

Honen ildotik, 5 motako mutazioak batez ere birziklapenerako ezinbestekoa den EGFP-rekiko homologoa den domeinua kodetzen duten exoietan ematen direla ikusi da⁴, aztergai den mutazioa bezala. Hala ere, nahiz eta mutazio mota honen eragile diren hondar gehienak β -propultsore itxurako egituraren egon, lan honetan pH azidoak eragindako aldaketa konformazionalean zuzenki parte hartzen ez duten hondarrek ere LDL askapenean eragina eduki dezaketela berretsi da. Izan ere, hartzaila natiboan egitura tertziarioa mantentzen duten hondarren arteko hainbat elkarrekintza daude (ligandoaren batuketarako domeinuko disulfuro zubiak esaterako) eta hauen oztopatzeak hartzailaren funtzionamenduan eragin dezake. Modu honetan, EGF-C-ko eta β -propultsore itxurako egiturako hondarren artean hidrogeno zubi bat eratzen da (6A irudia), LDLR-aren konformazio egokia mantentzen laguntzen duena. Honetarako Asp679 ezinbestekoa da eta beraz, honen ordezkapenak glizina batengatik Asp679 eta Thr489 arteko hidrogeno zubi ezabatzen du (6B irudia), hartzailaren egitura trinkoa galtzen delarik. Hala ere, egituraren aldaketa honek LDLR-aren funtzioa erabat deuseztatzeko nahikoa ez dela frogatu da.



6. Irudia. p.(Asp679Gly) aldaerak Thr489 hondarrarekin duen hidrogeno zubiaren desagertzea eragiten du. A) Asp679 eta Thr489 arteko hidrogeno zubiak hartzailearen egitura tertziarioa mantentzen du. B) Asp679 hondarraren ordezkapenak zistena batengatik aminoazidoen arteko elkarrekintza polarra desagertzea eragiten du. Irudi hau PyMOL bidez lortu da (DeLano Scientifics) (PDB: 1N7D).

Beraz, p.(Asp679Gly) aldaeraren pH-ren menpeko LDL askapen joerak endosoman ematen diren berregituraketa konformazionaletan orain arte uste ziren baino hondar eta aldaketa gehiago eragina dutela adieraziko luke.

5. Ondorioak

Lan honen emaitzek p.(Asp679Gly) aldaera patogenoa dela, % 50-eko aktibitate galera eragiten duela eta birziklapen akastuna indutzen duela egiaztatzen dute, 5 motako mutazio bezala sailkatuz. Modu berean, emaitza hauek LDLR aldaeren analisi funtzionalen beharra berresten dute, zeina etorkizunean medikuntza pertsonalizatua errazteko diagnostiko genetiko egoki bat burutzeko ezinbestekoa izango den.

6. Bibliografia

1. Brown, M. S. & Goldstein, J. L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*. **232**, 34–47 (1986).
2. Ference, B. A. *et al.* Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from

- the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur. Heart J.* **38**, 2459–2472 (2017).
3. Etxebarria, A. *et al.* Functional characterization and classification of frequent low-density lipoprotein receptor variants. *Hum. Mutat.* **36**, 129–141 (2015).
 4. Hobbs, H. H. *et al.* Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum. Mutat.* **1**, 445–466 (1992).
 5. Strøm, T. B. *et al.* The cytoplasmic domain is not involved in directing Class 5 mutant LDL receptors to lysosomal degradation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **408**, 642–6 (2011).
 6. Brown, M. S., Herz, J. & Goldstein, J. L. LDL-receptor structure. Calcium cages, acid baths and recycling receptors. *Nature.* **388**, 629–30 (1997).
 7. Rudenko, G. *et al.* Structure of the LDL receptor extracellular domain at endosomal pH. *Science.* **298**, 2353–2358 (2002).
 8. Jeon, H. *et al.* Implications for familial hypercholesterolemia from the structure of the LDL receptor YWTD-EGF domain pair. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 499–504 (2001).
 9. Davis, C. G. *et al.* Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region. *Nature.* **326**, 760–5 (1987).
 10. Goldstein J.L., Hobbs H.H., Brown M.S. Familial hypercholesterolemia. In: Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D., editors. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill; New York, NY, USA: 2001.
 11. Benito-Vicente, A. *et al.* Validation of LDLr Activity as a Tool to Improve Genetic Diagnosis of Familial Hypercholesterolemia: A Retrospective on Functional Characterization of LDLr Variants. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1676 (2018).
 12. Yokode, M. *et al.* Cytoplasmic sequence required for basolateral targeting of LDL receptor in livers of transgenic mice. *J. Cell Biol.* **117**, 39–46 (1992).
 13. Davis, C. G. *et al.* The J.D. mutation in familial hypercholesterolemia: amino acid substitution in cytoplasmic domain impedes internalization of LDL receptors. *Cell* **45**, 15–24 (1986).
 14. Lehrman, M. A., Goldstein, J. L., Brown, M. S., Russell, D. W. & Schneider, W. J. Internalization-defective LDL receptors produced by genes with nonsense and frameshift mutations that truncate the cytoplasmic domain. *Cell* **41**, 735–43 (1985).
 15. Chen, W. J., Goldstein, J. L. & Brown, M. S. NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* **265**, 3116–23 (1990).

16. Goldstein, J. L. & Brown, M. S. The LDL receptor and the regulation of cellular cholesterol metabolism. *J. Cell Sci. Suppl.* **3**, 131–7 (1985).
17. Hobbs, H. H., Russell, D. W., Brown, M. S. & Goldstein, J. L. The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein. *Annu. Rev. Genet.* **24**, 133–70 (1990).
18. Tolleshaug, H., Goldstein, J. L., Schneider, W. J. & Brown, M. S. Posttranslational processing of the LDL receptor and its genetic disruption in familial hypercholesterolemia. *Cell* **30**, 715–24 (1982).
19. Strøm, T. B., Laerdahl, J. K. & Leren, T. P. Mutation p.L799R in the LDLR, which affects the transmembrane domain of the LDLR, prevents membrane insertion and causes secretion of the mutant LDLR. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 5836–44 (2015).
20. Adzhubei, I. A. *et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods* **7**, 248–9 (2010).
21. Ng, P. C. SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3812–3814 (2003).
22. Grantham, R. Amino Acid Difference Formula to Help Explain Protein Evolution Amino Acid Difference Formula to Help Explain Protein Evolution. *Science.* **185**, 862–864 (1974).
23. Dardik, R. *et al.* Homocysteine and oxidized low density lipoprotein enhanced platelet adhesion to endothelial cells under flow conditions: distinct mechanisms of thrombogenic modulation. *Thromb. Haemost.* **83**, 338–44 (2000).
24. Culi, J. *et al.* Boca-dependent maturation of beta-propeller/EGF modules in low-density lipoprotein receptor proteins. *EMBO J.* **23**, 1372–1380 (2004).
25. Arias-Moreno, X. *et al.* Mechanism of low density lipoprotein (LDL) release in the endosome: implications of the stability and Ca²⁺ affinity of the fifth binding module of the LDL receptor. *J. Biol. Chem.* **283**, 22670–22679 (2008).