



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

Bases estructurales del transporte de Mg^{2+} mediado por los factores homeostáticos CNNM2 y CNNM4, y de su interacción oncogénica con las fosfatasas PRL.

Paula Giménez Mascarell

2019

Tesis dirigida por el Dr. L. Alfonso Martínez de la Cruz

Tabla de contenido

Listado de abreviaturas	1
Resumen	7
1. Introducción	11
1.1. HOMEOSTASIS	13
1.2. TRANSPORTE DE IONES Y MOLÉCULAS A TRAVÉS DE LAS MEMBRANAS CELULARES: Canales y transportadores	13
1.3. EL MAGNESIO	16
1.3.1. Homeostasis del Mg ²⁺ en células procariotas.....	17
1.3.1.1. Moléculas que median el transporte de Mg ²⁺ en células procariotas	17
1.3.2. Homeostasis del Mg ²⁺ en organismos eucariotas.....	23
1.4. FACTORES HOMEOSTÁTICOS CNNM	35
1.4.1. Estructura tridimensional de los factores homeostáticos CNNMs.	40
1.4.2. Ligandos y moléculas que interactúan con los CNNMs.	44
1.4.3. Macromoléculas que interactúan con los CNNMs: PRLs	47
2. Objetivos	51
3. Materiales y métodos	55
3.1. PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES	57
3.1.1. Sobreexpresión y purificación del constructo CNNM2 _{BAT}	57
3.1.2. Sobreexpresión y purificación del constructo CNNM2 _{CNMP}	59
3.1.3. Sobreexpresión y purificación de la fosfatasa PRL-1.....	60
3.1.4. Purificación del complejo CNNM2 _{BAT} -PRL-1	61
3.1.5. Sobreexpresión y purificación de CNNM4 _{BAT}	62
3.1.6. Sobreexpresión y purificación de CNNM4 _{CNMP}	63
3.1.7. Producción de CNNM4 _{CNMP} marcada con Selenio-Metionina.....	64
3.1.8. Sobreexpresión y purificación de la región intracelular de CNNM4 (CNNM4 _{BAT} -CNMP-Ctail)	65
3.1.9. Producción de mutantes CNNM4 _{CNMP} y CNNM4 _{BAT} -CNMP-Ctail F631A.....	65
3.1.10. Producción del complejo CNNM4 _{BAT} -CNMP-Ctail-PRL-1	66
3.2. TÉCNICAS COMPLEMENTARIAS EN LA PURIFICACIÓN DE PROTEÍNA	67
3.2.1. Electroforesis en gel de acrilamida	67
3.2.2. Determinación de la concentración de proteína.....	67
3.2.3. Determinación de parámetros estándar de proteínas	68
3.3. CRISTALIZACIÓN DE PROTEÍNAS	69
3.3.1. Cristalización del complejo CNNM2 _{BAT} -PRL-1.....	69
3.3.2. Cristalización de CNNM4 _{BAT}	71
3.3.3. Cristalización de CNNM4 _{CNMP}	71
3.4. RESOLUCIÓN ESTRUCTURAL POR TÉCNICAS CRISTALOGRAFICAS DE RAYOS X.	72
3.4.1. Resolución estructural del complejo CNNM2 _{BAT} -PRL-1.	72
3.4.2. Resolución estructural de CNNM4 _{BAT}	74
3.4.3. Resolución estructural de CNNM4 _{CNMP}	74
3.5. DISPERSIÓN DE RAYOS X A BAJO ÁNGULO (SAXS)	75
3.6. DISPERSIÓN DE LUZ MULTIÁNGULO (MALS)	76
4. Resultados	79
4.1. DISEÑO DE CONSTRUCTOS DE LAS PROTEÍNAS CNNM	81

Capítulo 1. Estructura de CNNM4	85
4.2. MÓDULO BATEMAN DE CNNM4 (CNNM4_{BAT})	87
4.2.1. Estructura cristalina de CNNM4 _{BAT}	88
4.3. ESTRUCTURA DEL DOMINIO CNMP	99
4.3.1. Sobreexpresión y purificación del dominio cNMP de CNNM2 y CNNM4.	100
4.3.2. Cristalización del dominio cNMP.....	101
4.3.3. Estudio cristalográfico preliminar de CNNM4 _{CNMP}	103
4.3.4. Estructura cristalina de CNNM4 _{CNMP}	105
4.4. ESTRUCTURA DE LA REGIÓN INTRACELULAR DE LAS PROTEÍNAS CNNM	116
4.4.1. Estructura en solución de la región intracelular de CNNM4	117
4.4.2. Función estructural del dominio cNMP de CNNM4	123
Capítulo 2. Bases estructurales de la interacción oncogénica de los CNNMs con las fosfatasa de la familia PRL	125
4.5. CNNM2_{BAT} INTERACCIONA CON LAS PROTEÍNAS PRLS	127
4.6. COMPLEJO CNNM2_{BAT}·PRL-1	128
4.6.1. Cristalización del complejo CNNM2 _{BAT} ·PRL-1.	128
4.6.2. Estructura cristalina del complejo CNNM2 _{BAT} ·PRL-1.	130
4.6.3. CNNM2 _{CNMP} no interacciona con CNNM2 _{BAT} y PRL-1.	134
4.6.4. La unión de PRL-1 aplanar el módulo CBS de CNNM2.	135
4.6.5. La unión de ATP no varía conformacionalmente el complejo CNNM2 _{BAT} ·PRL-1.	137
4.7. ESTRUCTURA DEL COMPLEJO CNNM4_{BAT-CNMP-CTAIL} CON PRL-1	139
5. Discusión	143
6. Conclusiones	161
7. Bibliografía	165
8. Publicaciones	187

Listado de abreviaturas

Abreviaturas

Listado de abreviaturas

La siguiente lista describe el significado de diferentes abreviaturas y acrónimos utilizados a lo largo del texto de esta tesis.

ACD: "Ancient Conserved Domain" (Dominio ancestral conservado)

ACDP: "Ancient Conserved Domain Protein" (Proteína de dominio ancestral conservado)

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADP: Adenosín difosfato

ADPnP: Adenosina 5'-(β , γ -imido) trifosfato

AMP: Adenosín monofosfato

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

AP: "Adaptor protein" Proteína adaptadora de clatrina

ARN: Ácido ribonucleico

ATP: Adenosín trifosfato

A.U: "Asymmetric Unit" (Unidad Asimétrica)

BSA: "Bovine serum albumin" (Albúmina de suero bovina)

CBS: Cistationina β -sintasa

CDK: "Cyclin-dependent kinase" (Proteína kinasa dependiente de ciclina)

CNBD: "Cyclic nucleotide binding domain" (Dominio de unión a nucleótidos cíclicos)

CNGC: "Cyclic Nucleotide Gated Channel" (Canal regulado por nucleótidos cíclicos)

cNMP: "Cyclic Nucleotide MonoPhosphate" (Nucleótido cíclico monofosfato)

CNNM: "Cyclin and CBS domain divalent metal cation transport mediators"

CNT: "Connecting tubule" (Túbulo de conexión)

CV: "Column Volume" (Volumen de columna)

DCT: "Distal Convoluted tubule" (Túbulo contorneado distal)

Dmax: Distancia máxima

DSP: Dual-specificity phosphatase (fosfatasa de especificidad dual)

DTT: Ditiotreitól

Abreviaturas

DUF21: "Domain of Unknown Function 21" (Dominio de función desconocida 21)

GMPc: Guanosín monofosfato cíclico

GST: Glutación-S-transferasa

HCN: "Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels" (Canales activados por hiperpolarización y nucleótidos cíclicos)

IMAC: "Immobilized metal affinity chromatography" (Cromatografía de afinidad por un ión metálico inmovilizado)

IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

ITC: "Isothermal Titration Calorimetry" (Titulación calorimétrica isoterma)

JS: "Jalili syndrome" Síndrome de Jalili

K_D: Constante de disociación

K_m: Constante de Michaelis-Menten

KO: "KnockOut"

LB: Luria-Bertani

MagT1: "Magnesium transporter subtype 1"

MALS: "Multiangle light scattering" (Dispersión de luz multiángulo)

MgATP: Complejo magnesio-adenosín trifosfato

MgtA/B: "Magnesium transporter A y B" (Transportador de magnesio A y B)

MgtC: "Magnesium transporter C" (Transportador de magnesio C)

MgtE: "Magnesium transporter E" (Transportador de magnesio E)

MmgT1/2: "Membrane magnesium transporter 1 y 2"

MR: "Molecular replacement" (Reemplazamiento molecular)

MRS2: "Mitochondrial RNA splicing 2"

NIPA: "Nonimprinted in Prader-Willi/Angelman syndrome"

O/N: "Over night" (Durante toda la noche)

PBC: "Phosphate Binding Cassette" (casete de unión de fosfatos)

PBS: "Phosphate buffered saline" (Tampón fosfato salino)

PEG: Polietilenglicol

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonio

Abreviaturas

- PRL:** "Phosphatases of the Regenerating Liver" (Fosfatasas del hígado regenerante)
- PT:** "Proximal tubule" (Túbulo proximal)
- PTP:** "Protein tyrosine phosphatase" (Proteína tirosina fosfatasa)
- Rg:** Radio de giro
- RMN:** Resonancia magnética nuclear
- S1/2:** Sitio 1 y sitio 2
- SAD:** "Single-wavelength Anomalous Dispersion" (Difracción anómala simple)
- SAXS:** "Single Angle X-Ray scattering" (Dispersión de rayos-X a bajo ángulo)
- SDS-PAGE:** "Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel" (Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico)
- SDS:** "Sodium dodecyl sulfate" (Dodecil sulfato sódico)
- ShRNA:** "Short hairping RNA"
- SLC41A1-3:** "Solute carrier family 41 member 1-3"
- SPC:** "Signal peptidase complex" (Complejo de la peptidasa señal)
- SPR:** "Surface Plasmon Resonance"
- TAL:** "Thick ascending limb of Henle's loop" (Rama ascendente gruesa del asa de Henle)
- TEV:** "Tobacco etch virus"
- TM:** Transmembrana
- TMD:** "Transmembrane Domain" (Dominio transmembrana)
- TRPM6/7:** "Transient receptor potential cation channel subfamily M member 6/7"
- TRPV1:** "Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1"
- V_M:** Volumen de Matthews
- VPD:** "Voltage dependent Potentiation" (Potenciación dependiente de voltaje)

Resumen

Resumen

El magnesio (Mg^{2+}), segundo catión intracelular más abundante después del potasio (K^+), es un ión imprescindible en funciones vitales como la neurotransmisión, la proliferación celular o la actividad enzimática. Este papel biológico trascendental exige una homeostasis cuidadosamente regulada, en la que participan un número aún indeterminado de proteínas. De todas ellas, una de las familias menos estudiadas es la de los factores homeostáticos CNNM ("*Cyclin and CBS domain divalent metal cation transport mediators*"), inicialmente bautizados como Ancient Domain Proteins (ACDPs). Los CNNMs incluyen cuatro miembros (CNNM1-CNNM4) que presentan un patrón de expresión ubicuo, exceptuando CNNM1 que es predominante en el cerebro. La relevancia biológica de estas proteínas se hizo visible al descubrir que una deficiencia en su actividad, debida a la presencia de mutaciones, estaba ligada al desarrollo de diferentes patologías hereditarias de escasa prevalencia y origen recesivo, como la hipomagnesemia familiar dominante (CNNM2), o el síndrome de Jalili (CNNM4). Estudios más recientes han revelado su implicación en enfermedades de alta prevalencia, como el Alzheimer, el cáncer, la infertilidad, o desórdenes neuropsiquiátricos como la esquizofrenia asociados a un desarrollo anómalo de las estructuras cerebrales. Entre los hallazgos más llamativos se encuentra la habilidad de los CNNMs de interactuar con tirosina fosfatasas de la familia PRL (*Phosphatases of the regenerating liver*), reconocidos marcadores de oncogénesis y metástasis. La formación de estos complejos induce un aumento de la concentración intracelular de Mg^{2+} , que es aprovechada por las células tumorales para proliferar e invadir otros tejidos, aunque los mecanismos moleculares implicados en este proceso se desconocían hasta ahora.

Estructuralmente, los CNNMs son proteínas complejas e intrínsecamente dinámicas, sujetas a drásticos cambios conformacionales inducidos por la unión de fosfonucleótidos e iones Mg^{2+} . Su estructura multimodular incluye cuatro regiones independientes bien diferenciadas, unidas por largos segmentos peptídicos desestructurados y presumiblemente flexibles. Estas características han convertido tradicionalmente su cristalización y posterior análisis estructural en un gran desafío. El extremo N-terminal de los CNNMs es mayoritariamente extracelular, e incluye una única hélice transmembrana seguida de una región rica en láminas β . La región transmembranosa que se encuentra a continuación, denominada *dominio DUF21* (Domain of unknown Function-21), contiene tres o cuatro α -hélices, que algunos autores han considerado insuficientes para formar un poro iónico a través de la membrana. El extremo C-terminal del dominio DUF21 conecta a través de una larga α -hélice (hélice H0) con el primer módulo intracelular, denominado *módulo Bateman*, que a su vez está constituido por dos motivos *Cistationina β -sintasa* (o

Resumen

dominios CBS). A continuación del módulo Bateman, se encuentra el *dominio cNMP* (cyclic nucleotide monophosphate domain) cuya función sigue siendo una incógnita, a pesar de que su secuencia de amino ácidos muestre cierta similitud con dominios de unión a nucleótidos cíclicos monofosfato (CNBDs, cyclic nucleotide binding domains). Finalmente, el extremo C-terminal incluye una amplia región, probablemente desestructurada, conocida como *cola C* (C-tail), cuya longitud varía significativamente entre los diferentes miembros de la familia CNNM.

La naturaleza intrínseca de los CNNMs, con regiones transmembranas y fragmentos flexibles intra e intermodulares a lo largo de su cadena polipeptídica, ha impuesto enormes limitaciones para la realización de estudios cristalográficos desde su descubrimiento en el año 2003. Los primeros éxitos se obtuvieron aislando el módulo Bateman de CNNM2 de ratón, cuya estructura cristalina fue elucidada en el año 2014. Esta estructura demostró la capacidad de este dominio de auto asociarse y formar dímeros estables con forma de disco conocidos como *módulos CBS*, que unen ATP de manera Mg^{2+} -dependiente. Los resultados obtenidos permitieron además, conocer el efecto del ATP, que sin necesidad de hidrolizarse, induce un cambio conformacional en el módulo CBS haciéndolo progresar desde una conformación alabeada (“*twisted*”) a otra aplanada (“*flat*”), al unir el nucleótido. Este cambio estructural, que afecta a la orientación de la hélice H0 que une la región citoplasmática con la región transmembrana, permitió postular por primera vez el posible mecanismo por el que el módulo Bateman actúa de sensor intracelular de la concentración de Mg^{2+} , y regula su transporte a través de la membrana.

Esta tesis doctoral recoge una caracterización estructural y biofísica de la región intracelular de los factores homeostáticos del transporte de Mg^{2+} , CNNM2 y CNNM4, así como de sus complejos con la fosfatasa PRL-1. Los resultados obtenidos no permiten establecer todavía cuál es la función biológica de los CNNMs, pero aportan la mayor información estructural sobre esta familia de proteínas y el modelo tridimensional más detallado para llegar a diseñar drogas que modulen su actividad. Asimismo, permiten responder a algunas de las preguntas surgidas en diferentes estudios por parte de diferentes autores, como por ejemplo: 1) ¿por qué los CNNMs dependen del catión Mg^{2+} para unir ATP?; (2), ¿Qué papel desempeña cada uno de los dominios intracelulares en la función general de los CNNMs?; (3) ¿Qué estructura tienen?; (4) ¿Cuáles son las bases estructurales de la interacción oncogénica que establecen con las fosfatasas de la familia PRL?; (5) ¿Qué estrategias podrían seguirse para modular la actividad de estos factores homeostáticos farmacológicamente?; (6) ¿Podría hacerse de forma específica?

1. Introducción

1.1. HOMEOSTASIS

La homeostasis (del griego ὁμοίος *hómoios*, 'igual', 'similar', y στάσις *stásis*, 'estado', 'estabilidad'), es la capacidad que posee un organismo, órgano, tejido o célula, de mantener estables las condiciones de su medio interno dentro de unos límites concretos, compensando para ello los cambios que se producen en el entorno exterior en el que vive y se desarrolla¹. La homeostasis es posible gracias a la intervención de maquinarias moleculares complejas, en su mayoría proteínas, que regulan y permiten el intercambio de materia y energía con dicho medio exterior. Entre los parámetros sujetos a homeostasis, se encuentran, por ejemplo, la presión arterial, la frecuencia respiratoria, los niveles de glucosa en sangre, la temperatura, el pH, o la concentración de iones. Este último proceso se conoce como *homeostasis iónica*.

1.2. TRANSPORTE DE IONES Y MOLÉCULAS A TRAVÉS DE LAS MEMBRANAS CELULARES: Canales y transportadores

Las membranas celulares tienen la misión de preservar la composición interna de la célula dentro de unos rangos estrictos que son compatibles con la vida. Una de las principales propiedades que permite el control de estos parámetros, reside en la permeabilidad de dichas membranas, que actúa de barrera e impide la libre difusión de los solutos (moléculas e iones), y solo permite su transporte de forma selectiva, a modo de filtro. Este transporte de solutos se clasifica habitualmente en función de si el proceso **no necesita energía (*transporte pasivo*)²**, o si por el contrario, **requiere de un consumo energético (*transporte activo*)^{2,3}**.

En el **transporte pasivo**, los iones se mueven a favor de un gradiente que aporta la fuerza de conducción para el movimiento. Dicho gradiente puede ser químico o electroquímico. El *gradiente químico* es debido, exclusivamente, a la diferencia de concentración de iones a ambos lados de la membrana. En cambio, el *gradiente electroquímico* combina diferencias en concentración (componente química) con variaciones en la carga eléctrica (componente eléctrica)⁴El transporte pasivo se subdivide, a su vez, en cuatro tipos diferentes:

(1) *Difusión simple o difusión pasiva*: representa el mecanismo de transporte más simple que permite a una molécula atravesar la membrana plasmática. La molécula simplemente se disuelve en la bicapa de fosfolípidos de la membrana, difunde a través de ella, y posteriormente se disuelve en la solución acuosa que está situada al otro lado. Este proceso no requiere la intervención de ninguna proteína, y la dirección de

Introducción

transporte siempre viene determinada por las concentraciones relativas de la molécula en el interior y en exterior de la célula. La difusión de la molécula transcurre hasta que se alcanza un equilibrio de concentración a ambos lados de la membrana. Una característica importante de este tipo de transporte, es que no es selectivo, y siempre tiene lugar a favor de gradiente. Solo pueden realizarlo moléculas pequeñas hidrofóbicas, gases como el oxígeno (O_2) y el dióxido de carbono (CO_2), y pequeñas moléculas polares pero sin carga, como el H_2O o el etanol. No son susceptibles de este tipo de transporte moléculas grandes polares, con carga o sin ella, como la glucosa, o los aminoácidos, o iones (con carga) como H^+ , Na^+ , K^+ , y Cl^- . Estos solutos son incapaces de disolverse en la bicapa lipídica y no pueden atravesar la membrana. Para ello, requieren la ayuda de proteínas específicas que ofrecen otros mecanismos de transporte².

(2) *Difusión facilitada*: La difusión facilitada comparte con la difusión pasiva el hecho de que las moléculas se mueven siguiendo la dirección determinada por su concentración relativa en el interior y en el exterior de la célula (de mayor a menor concentración). Este tipo de transporte no requiere energía, y a diferencia de la difusión pasiva, permite el traslado de moléculas que no son capaces de disolverse en la membrana lipídica. Ante esta incapacidad, el transporte es realizado por proteínas embebidas en las membranas celulares. Estas proteínas se clasifican en dos tipos: *carriers* y *channels* (*canales*).

Los *carriers* son proteínas que unen y transportan selectivamente pequeñas moléculas (azúcares, aminoácidos y nucleósidos) a través de las membranas. Los canales son proteínas integrales de membrana que abren y cierran poros en la bicapa lipídica, a través de los cuales es posible una translocación física de iones o moléculas, que difunden libremente si poseen el tamaño y la carga adecuadas. El movimiento de los iones a través de estos poros se produce siempre a favor del gradiente electroquímico³ (Fig 1.1.). Una característica importante de los canales es que facilitan una difusión mucho más rápida que la de los *carriers* y son muy selectivos en el tipo de molécula o ión que transportan, delimitando el tamaño y las características del poro que forman. Los canales adoptan distintos estados conformacionales (abierto o cerrado), que son transitorios (no permanecen constantemente abiertos o cerrados).

Los canales iónicos se clasifican en función de cómo se regula su apertura. Si ésta está modulada por cambios en el potencial de membrana (La distribución desigual de cargas a ambos lados de una membrana biológica, genera una diferencia de potencial que se conoce con el nombre de *potencial de membrana*⁴), se considera que

Introducción

el canal es *dependiente de voltaje* (*voltaje-gated channels*)^{3,5-7}. Si la apertura depende de la unión a una pequeña molécula (como por ejemplo, neurotransmisores o segundos mensajeros intracelulares), el canal se denomina *dependiente de ligando* (*ligand-gated channels*)^{3,8,9}. La capacidad de apertura-cierre de los canales, permite a la célula regular los gradientes iónicos a través de sus membranas y alterar el potencial electroquímico de las mismas^{7,10}. Generalmente, los canales se asocian formando entidades oligoméricas en las que cada subunidad aporta un número variable de hélices transmembranosas, que en conjunto permiten la formación de un poro en la membrana^{3,7,11}. Ejemplos de canales iónicos, son los canales de Na⁺ dependientes de voltaje, que desempeñan un papel fundamental en la fase de despolarización durante el potencial de acción¹² (Fig.1.1.). Cuando la neurona recibe un estímulo, los canales de Na⁺ se abren, permitiendo que los iones accedan a favor de gradiente al citoplasma celular. Como consecuencia, el potencial de membrana varía y se hace positivo, proceso que se denomina *despolarización*¹². Cuando la despolarización alcanza cierto valor umbral, se produce lo que se denomina *potencial de acción* (cambios en el potencial de membrana que se propagan a lo largo de la superficie de una célula)¹².

(3) *Filtración*: La filtración consiste en el movimiento de solutos a través de las membranas debido a la presión hidrostática que se genera en el medio, por ejemplo generada por el sistema vascular. Este tipo de transporte está delimitado tanto por el tamaño de los solutos, como por el de los poros de la membrana.

(4) *Ósmosis*: es un tipo de difusión simple, que suele referirse exclusivamente al movimiento de moléculas de agua a través de una membrana permeable.

En el **transporte activo**, el movimiento de los solutos transcurre en contra de gradiente de concentración (es decir desde una zona de baja concentración, a otra de mayor concentración) o de los gradientes electroquímicos, lo que exige **consumo energético**³ (Fig. 1.1.). El transporte activo es llevado a cabo por proteínas especializadas denominadas *transportadores iónicos*. La energía esencial para el transporte activo puede provenir de dos fuentes: (i) la hidrólisis de ATP (*transporte activo primario*) y (ii) de un gradiente electroquímico, (*transporte activo secundario*).

Los *transportadores activos primarios*, también denominados *bombas*, acoplan directamente el transporte de un ión a la hidrólisis de ATP^{3,13}. Una de las bombas mejor caracterizadas es la bomba Na⁺- K⁺-ATPasa, que transporta activamente 3 iones sodio (Na⁺) al compartimento extracelular intercambiándolos con 2 iones potasio (K⁺) que se

Introducción

desplazan hacia el interior del citosol^{3,14,15} (Fig.1.1.). Este bombeo continuo de iones permite mantener el potencial de membrana en la célula^{3,14}.

Los *transportadores activos secundarios* acoplan el movimiento de un ión en contra de su gradiente electroquímico, al movimiento de otro ión a favor del gradiente³. Este mecanismo es utilizado, por ejemplo, por el cotransportador $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ ¹⁶ (Fig 1.1.).

En función del número de iones y la dirección en que son transportados, las proteínas encargadas del transporte activo de iones (tanto primario como secundario) pueden subdividirse en:

- (i) **Cotransportadores**, que desplazan ambos iones en la misma dirección (por ejemplo el cotransportador $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ ¹⁶);
- (ii) **Intercambiadores**, (*exchangers*) que desplazan los iones en direcciones opuestas (por ejemplo, el intercambiador $\text{Na}^+\text{/H}^+$ ¹⁷) (Fig1.1.).

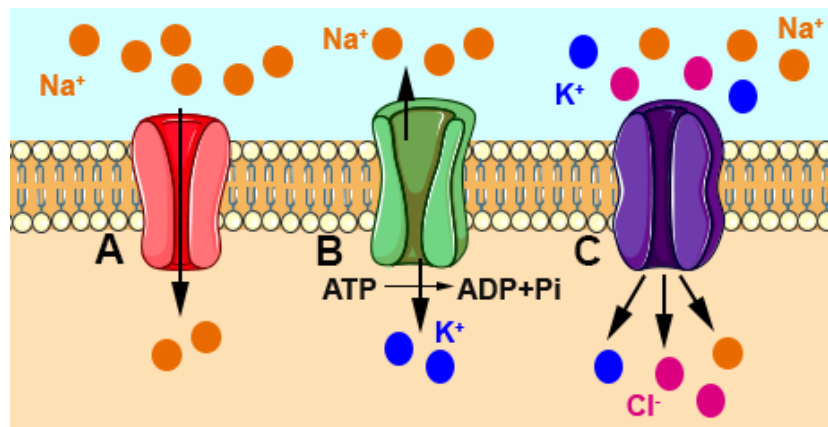


Figura.1.1. Transporte de iones en la célula. (A) Representa un canal de Na^+ donde el ión se desplaza a favor de gradiente (transporte pasivo). (B) Representación de la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ que intercambia 3Na^+ y 2K^+ mediante la hidrólisis de ATP (intercambiador, transporte activo primario). (C) Representación del transportador $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ que transporta tres iones diferentes en la misma dirección (cotransportador, transporte activo secundario).

1.3. EL MAGNESIO

El magnesio, elemento de número atómico 12 en la tabla periódica, es un metal alcalino-térreo del grupo 2, esencial para la vida de todos los organismos conocidos. La alta densidad de carga de su forma iónica (Mg^{2+}) favorece que al ser disuelto en agua, se rodee de varias esferas de solvatación¹⁸. El radio iónico del Mg^{2+} en su estado hidratado es aproximadamente cuatrocientas veces mayor que cuando está desprovisto de su esfera de solvatación. Esta característica lo diferencia de otros cationes abundantes en el cuerpo humano como el sodio (Na^+) y el calcio (Ca^{2+}), cuyo radio

Introducción

hidratado es veinticinco veces mayor que el deshidratado, o el potasio (K^+) que es solo cuatro veces mayor^{18,19}. Esta característica explica muchas particularidades del Mg^{2+} , como su comportamiento antagonista al del Ca^{2+} , que presenta la misma carga²⁰. Por ejemplo, la incapacidad de perder fácilmente su esfera de solvatación hace que el Mg^{2+} sea incapaz de atravesar los poros de canales estrechos que son fácilmente accesibles para el Ca^{2+} ^{18,19}. Por ello, se ha postulado que las proteínas que transportan Mg^{2+} deben ser capaces de reconocer el catión hidratado, despojarle de su cubierta de hidratación y hacerlo atravesar la membrana^{18,19,21,22}. Los mecanismos de transporte de Mg^{2+} a través de las membranas celulares no se han estudiado tan exhaustivamente como los de otros cationes como el Na^+ o el K^+ . Una de las razones es el desconocimiento de la identidad de los actores moleculares implicados. En los últimos años se han conseguido identificar algunas de estas proteínas, tanto en células procariotas^{11,23-25}, como en células eucariotas^{21,26-29}.

1.3.1. Homeostasis del Mg^{2+} en células procariotas.

En los organismos procariotas, el Mg^{2+} juega un papel crítico, actuando como cofactor en gran variedad de reacciones enzimáticas, así como en la replicación del ADN y la síntesis de proteínas³⁰. Representa también un componente esencial en la pared celular de bacterias Gram positivas, ya que participa en la síntesis del peptidoglicano³¹. Es conocida la conexión entre la homeostasis del Mg^{2+} y la virulencia de patógenos como *Yersinia pestis* (agente causante de la peste)³², *Shigella flexneri* (causante de diarreas en humanos)³³ *Pseudomonas aeruginosa* (patógeno oportunista en individuos inmunodeprimidos que infecta principalmente las vías respiratorias y urinarias)³⁴, *Salmonella entérica* (bacteria gram negativa causante de la epidemia de cocoliztli de 1576 que mató al 80% de la población azteca)³⁵, o *Erwinia carotovora* (que infecta numerosas hortalizas y verduras)³⁶.

1.3.1.1. Moléculas que median el transporte de Mg^{2+} en células procariotas.

Hasta la fecha, se han identificado cuatro familias de proteínas implicadas en el transporte de Mg^{2+} en organismos procariotas: (i) el sistema de transporte CorA, que engloba las proteínas CorA, CorB, CorC y CorD³⁷; (ii) el sistema MgtA y MgtB/C³⁸; (iii) el canal MgtE³⁹; y (iv) el factor de tolerancia al Mg^{2+} SA0657⁴⁰. De todas estas moléculas, las más exhaustivamente estudiadas son los canales MgtE y CorA, que facilitan la entrada de Mg^{2+} en bacterias¹¹. El conocimiento de la estructura cristalina de ambos

Introducción

canales ha permitido avanzar en el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en el transporte de este catión.

CorA

El transporte de Mg^{2+} mediado por la proteína CorA (bautizada a partir de su descubrimiento en bacterias mutantes resistentes a Cobalto (Co^{2+})⁴¹⁻⁴³ es el más exhaustivamente estudiado de entre todas las proteínas identificadas en el transporte de Mg^{2+} ¹¹. CorA es el canal principal de Mg^{2+} en células procariotas y se encuentra codificado por aproximadamente la mitad de los genomas procariotas secuenciados, tanto en eubacterias como en arqueobacterias⁴⁴. CorA media la entrada de Mg^{2+} en las bacterias, aunque también se ha sugerido que mantiene la concentración intracelular de Co^{2+} en organismos termófilos⁴⁵. De forma análoga al canal MgtE (descrito más adelante), CorA utiliza el gradiente electroquímico a través de la membrana citoplasmática para transportar sus sustratos²². Ello ha hecho que se le considere más un canal que un transportador⁴⁶. Esta dependencia del potencial de membrana hace que el transporte de iones que promueve se vea influenciado por cambios externos en el pH o por fluctuaciones en la concentración de otros iones.

CorA es junto con MgtE el único transportador primario de Mg^{2+} cuya estructura cristalina se conoce en su totalidad en presencia^{45,47} y en ausencia de cationes divalentes (Mg^{2+} y Ca^{2+})^{48,49}. La proteína está constituida por una gran región N-terminal, conectada con una región C-terminal de menor tamaño a través de una larga α -hélice. La región C-terminal contiene dos hélices transmembranas. Para ser funcionalmente activo, CorA se asocia consigo misma formando homopentámeros con forma de embudo (Fig. 1.2), que en total contienen 10 segmentos transmembrana. La unidad funcional forma un poro central que atraviesa la membrana y alcanza la región intracelular^{11,47} (Fig. 1.2). La estructura cristalina reveló que los cationes se unen tanto al poro central como a la región intracelular. Esta última presenta regiones ricas en residuos ácidos que se sitúan entre las diferentes subunidades^{46,47} (Fig. 1.2). La unión de Mg^{2+} a regiones ácidas modula la actividad del canal¹¹. En cada subunidad hay cinco sitios de unión a Mg^{2+} . Al unirse, los iones Mg^{2+} aumentan el número de contactos entre subunidades y estabilizan la conformación cerrada del canal⁴⁸.

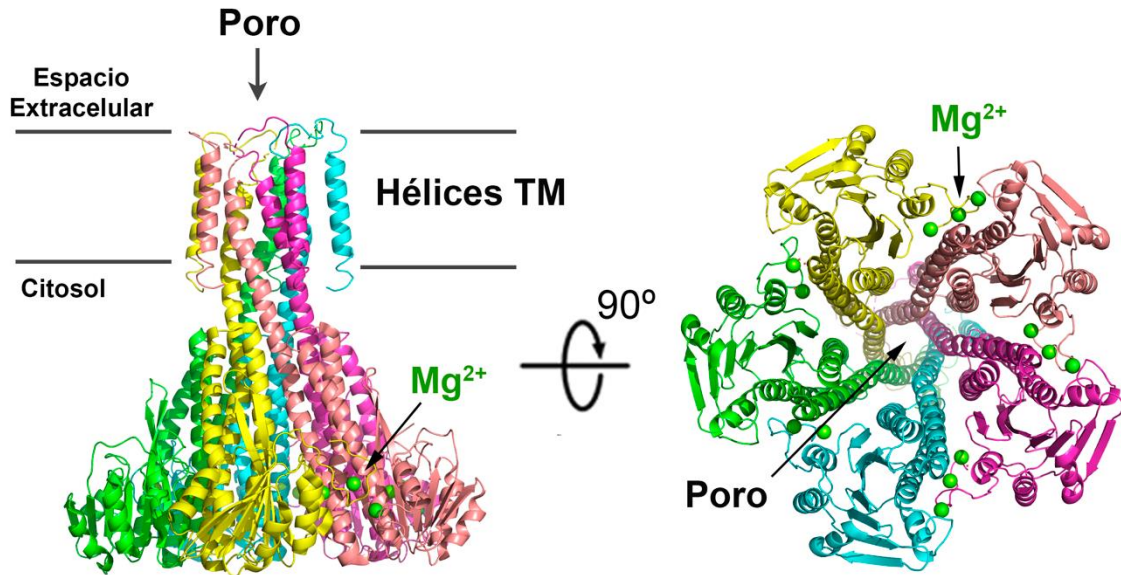


Figura 1.2. Estructura del canal procarionta CorA. Dos vistas de la estructura *full length* del canal CorA en su conformación cerrada. La presencia de átomos de Mg^{2+} (Esferas verdes) unidos en las interfaces entre subunidades (cian, magenta, rosa, amarillo y verde respectivamente) incrementa los contactos entre las mismas, reduciendo el tamaño del poro e impidiendo la entrada de Mg^{2+} . TM quiere decir Transmembrana.

En presencia de Mg^{2+} , el poro es demasiado estrecho para permitir la entrada de iones^{48,50}. Aunque el mecanismo exacto de apertura o cierre sigue siendo desconocido, se ha descrito que la selectividad de CorA por Mg^{2+} se debe a un motivo conservado Gly-Met-Asn (GMN) localizado en la entrada del poro. Este motivo es capaz de reconocer el ion Mg^{2+} con seis capas de hidratación^{11,50}.

CorB, CorC y CorD.

Los genes que codifican las proteínas CorB, CorC y CorD fueron identificados en un cribado genético de mutantes que conferían resistencia al Co^{2+} en la bacteria *Salmonella typhimurium*³⁷. Aunque ha sido ampliamente demostrado que CorA media la entrada de Mg^{2+} ^{46,48,50}, también se ha postulado que pueda mediar el eflujo de este ion³⁷. Este proceso requiere la expresión de al menos una de las proteínas CorB, CorC o CorD³⁷.

CorB y CorC muestran una alta homología de secuencia de aminoácidos entre sí. Ambas proteínas poseen un par de motivos CBS (código PFAM 00571) seguidos de un dominio conservado CorC_HlyC (código PFAM PF03471). CorB contiene, además, una región transmembranosa denominada DUF21 (por sus siglas en inglés “Domain of Unknown Function 21”, código PFAM: PF01595). Las estructuras cristalinas del módulo Bateman (Códigos PDB 4HG0, 5YZ2, 3NQR, 3JTF) y del dominio CorC_HlyC (Códigos PDB 2PLI, 2PLS, 2R8D) han sido resueltas de forma independiente, aunque no se han

Introducción

reportado las publicaciones correspondientes asociadas a dichas estructuras salvo en el caso de la estructura con código PDB 5YZZ. Esta entrada describe el módulo Bateman de CorC unido a AMP. El nucleótido muestra dos conformaciones alternativas C2' y C3'-endo^{51,52}. Se ha propuesto que el dominio CorC-HlyC, presente en algunos intercambiadores de Na⁺/H⁺, está implicado en la regulación de la actividad y en la modulación de la entrada de iones⁵³.

MgtA, MgtB y MgtC

La primera evidencia de la existencia de estos genes fue publicada en 1972⁴³. Se identificaron como un sistema de entrada de Mg²⁺ en *Escherichia coli* y en *Salmonella typhimurium*. La bacteria *S. typhimurium* además de CorA presenta otros dos loci relacionados con el transporte de Mg²⁺: mgtA y mgtBC²². El locus de MgtA codifica para un único gen, mientras que el locus de mgtBC codifica para dos genes diferentes, MgtC y MgtB^{22,25}. MgtA y MgtB son proteínas pertenecientes a la familia de P-ATPasas⁵⁴ que utilizan ATP para transportar el Mg²⁺ en contra de gradiente. Son por tanto, transportadores activos primarios. Curiosamente, estas ATPasas tiene menor homología con otras P-ATPasas procariotas (alrededor del 25%) que con las P-ATPasas de mamíferos (alrededor del 50%) como la Ca-ATPasa presente en el retículo sarcoplásmico^{38,55}. Tanto el locus de MgtA como el locus de mgtBC están regulados por el sistema de transducción de señales de dos componentes PhoPQ, que es un importante factor de virulencia en *Salmonella sp.*^{56,57}. PhoQ es un receptor de Mg²⁺ unido a la membrana²⁵. Cuando la concentración de Mg²⁺ extracelular disminuye, el Mg²⁺ que se encuentra unido a PhoQ, se disocia activando a la proteína, que fosforila, y por tanto activa, al factor de transcripción PhoP que regula la transcripción de más de 40 genes entre los que se encuentran MgtA y MgtB/C^{22,25,58}. Por tanto, es necesaria una concentración baja de Mg²⁺ extracelular para que se sobreexpresen MgtA y MgtB^{22,25}. Por otro lado, aunque se postuló inicialmente que MgtC mediaba el transporte de Mg²⁺, actualmente se sabe que es un factor de virulencia en *Salmonella*^{35,59}.

MgtE

La proteína MgtE fue identificada a mediados de los años 90 por Maguire y colaboradores, buscando genes que restablecieran el transporte de Mg²⁺ en la cepa de *Salmonella typhimurium* MM281, la cual carece de los mecanismos de transporte CorA, MgtA y MgtB⁶⁰. Posteriormente, además de en *Salmonella sp.*, se identificó en un amplio rango de bacterias Gram positivas y Gram negativas^{39,60}. MgtE es el segundo canal de Mg²⁺ más abundante en procariotas después de CorA y su mecanismo de transporte,

Introducción

así como su estructura cristalina, han sido descritos⁶¹⁻⁶³. Estructuralmente, cada subunidad de MgtE contiene una región N-terminal intracelular de función reguladora, y una región C-terminal embebida en la membrana plasmática que forma el poro de paso de los iones. MgtE se asocia en homodímeros (Fig 1.3). Cada monómero aporta cinco hélices transmembrana, que suman un total de diez hélices, análogamente a la proteína CorA^{46,47} (Fig 1.2). La región citosólica incluye dos dominios: el primero, denominado *dominio N*, está situado en el extremo N-terminal y forma una súper hélice de diez hélices α (Fig 1.3). Este dominio es estructuralmente homólogo al dominio soluble de FliG, un componente del flagelo bacteriano⁶⁴. A continuación del *dominio N* hay dos motivos CBS (también denominado módulo Bateman⁶⁵(Fig 1.3), que en línea con la dimerización global de la proteína, forman una estructura dimérica con forma de disco conocida como *módulo CBS*⁶⁶ de disposición paralela (los extremos N y C terminal de módulos Bateman complementarios apuntan hacia el mismo extremo)^{67,68} (Fig 1.3.). La estructura cristalina de la proteína completa (*full length*) de MgtE de *Thermus thermophilus* (*TmMgtE*) fue resuelta en 2007 por Hattori y colaboradores⁶⁸.

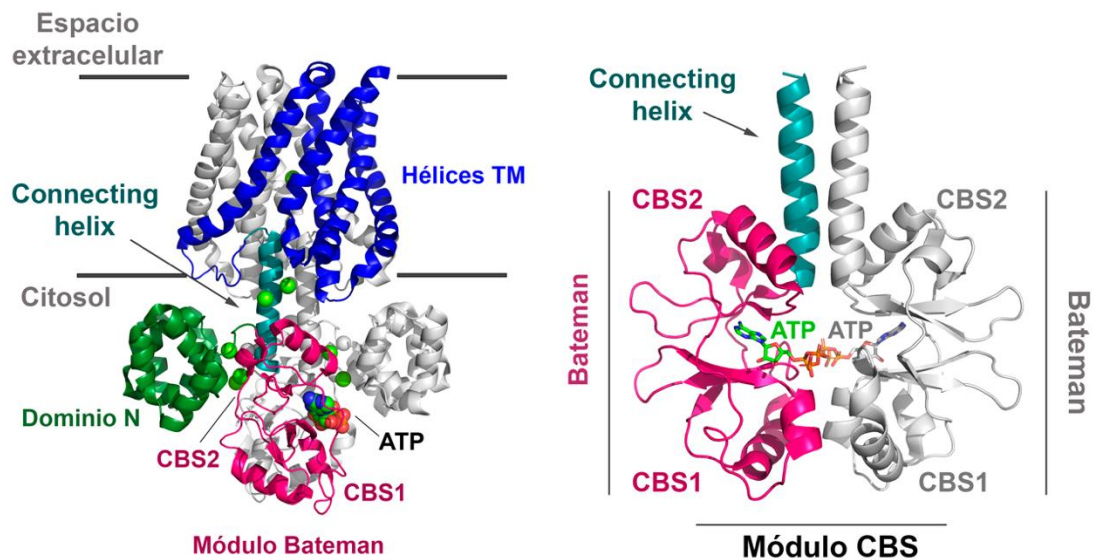


Figura 1.3. Estructura del canal de Mg^{2+} procariota MgtE. Figura adaptada de Tomita *et al.*⁶⁹ (Izquierda) Estructura *full length* del canal de Mg^{2+} MgtE en presencia de ATP. Este canal forma dímeros (una subunidad se muestra en colores y la otra en gris claro), donde cada monómero contiene un dominio N terminal (en verde), un módulo Bateman (magenta, formado por los motivos CBS1 y CBS2 respectivamente), una hélice de conexión (*connecting hélix*, en color aguamarina) y 5 hélices transmembrana (hélices TM, en azul). La molécula de ATP unida se representa en verde, y los iones Mg^{2+} es esferas verdes. (Derecha) Estructura del módulo CBS (dímero de módulos Bateman) del canal MgtE. Un módulo Bateman se representa en magenta, y el complementario en gris claro. El módulo CBS de MgtE es paralelo, es decir, los motivos CBS1 y CBS2 se enfrentan con sus respectivos complementarios. El módulo Bateman de MgtE une ATP en la cavidad S1 (un ATP se representa en verde y el complementario en gris claro).

La región intracelular aislada fue elucidada en este mismo trabajo tanto en presencia como en ausencia de Mg^{2+} . Por cada monómero de MgtE se observaron seis átomos

Introducción

de Mg^{2+} unidos (Fig 1.3). El estudio comparativo de las formas apo y holo, junto con un estudio de dinámica molecular⁶³ reveló que la unión de este catión a la región citosólica de la proteína estabiliza una conformación cerrada del canal. Los autores concluyeron que la región citosólica formada por un módulo CBS actúa como un sensor que regula la entrada de Mg^{2+} en la bacteria. Estudios posteriores demostraron que la unión de Mg^{2+} a la región citosólica de MgtE conduce al cierre del canal⁶¹.

En 2017, Tomita y colaboradores⁶⁹ demostraron que MgtE une ATP en el módulo Bateman de forma análoga a otras proteínas que contienen este dominio^{65,67,70}. Se demostró que la unión de ATP a MgtE es crítica para aumentar su afinidad por Mg^{2+} y situarla en el rango fisiológico del ión. La unión de ATP, por tanto, modula la estabilización de la conformación cerrada del canal, (Fig 1.4.) y le permite actuar como un sensor de Mg^{2+} en la célula a una concentración intracelular definida de iones Mg^{2+} . Usando técnicas de electrofisiología, los autores demostraron que concentraciones de ATP > 3mM inhibían el transporte de Mg^{2+} completamente, y que MgtE es un canal dependiente de ligando (Fig.1.4.)

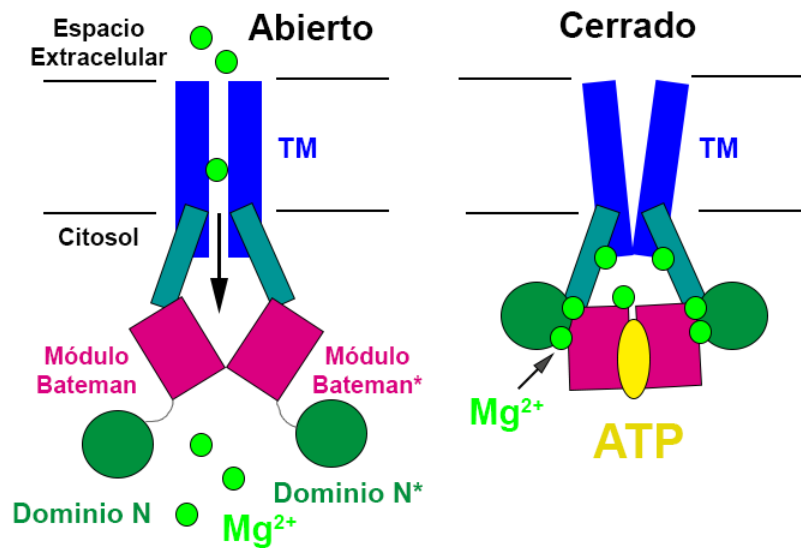


Figura 1.4. Esquema del mecanismo de transporte a través de MgtE. Figura adaptada de ⁶⁹ La unión de ATP (amarillo) y Mg^{2+} (esferas verde claro) a la región intracelular de MgtE (el ATP se une a los dominios CBS) provoca un cambio conformacional el cual se transmite al poro y hace que se cierre el canal y por tanto deje de entrar Mg^{2+} . La región transmembrana (TM) se representa en azul, los dominios CBS en magenta y el dominio N en verde.

Factor de tolerancia al Mg^{2+} SA0657

En el año 2014 un estudio reveló que la tolerancia a altas concentraciones de Mg^{2+} variaba en función del organismo procarionta⁷¹. Así por ejemplo, el crecimiento de *Salmonella typhimurium* se inhibe a concentraciones de Mg^{2+} en el medio de 285mM,

Introducción

mientras que el patógeno oportunista *Staphylococcus aureus* tolera concentraciones de Mg^{2+} en el medio de hasta $770mM^{71}$. Mediante anotación genómica (atribuir función biológica a secuencias de ADN⁷²) se mostró que *S. aureus* presenta un gen similar a *mgtE* (SA0867), dos genes relacionados con *corA* (SA0657 y SA0780) y dos genes homólogos al gen identificado en *Salmonella* *corB* (SA0657 y SA0780), ninguno de los cuales había sido estudiado⁴⁰. De estos genes el único estudiado ha sido el gen SA0657, que es el responsable de la alta tolerancia al Mg^{2+} de *S. Aureus*, por lo que se ha propuesto que media la extrusión de Mg^{2+} de la célula⁴⁰. La proteína SA06576 contiene una región transmembrana DUF21 seguida de un módulo Bateman y un dominio CorC-HlyC⁴⁰ de la misma manera que sus homólogo en *Salmonella* CorB y CorC^{37,53}. Se demostró, que el módulo Bateman es clave en la tolerancia a los iones Mg^{2+} ⁴⁰ como ocurre en el canal *MgtE*⁶⁸ o en los canales de cloruro (Cl⁻) de la familia CLC⁷³. Estos trabajos llevaron a postular que *S. aureus* mantiene la homeostasis del Mg^{2+} a través de la entrada de cationes mediada por CorA y *MgtE* y una posible extrusión mediada por SA0657⁴⁰.

1.3.2. Homeostasis del Mg^{2+} en organismos eucariotas.

El transporte de Mg^{2+} en células eucariotas ha sido mucho menos estudiado que el de bacterias. El esfuerzo experimental realizado a lo largo de los últimos veinte años, ha permitido identificar algunas de las proteínas implicadas en la homeostasis de este catión en levaduras, plantas y mamíferos:

1.3.2.1. El Mg^{2+} en las plantas.

El Mg^{2+} es un nutriente esencial para el crecimiento de las plantas. Es necesario en el proceso de fotosíntesis, en la activación enzimática y en la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas^{74,75}. Los tejidos vegetales necesitan mantener concentraciones altas de Mg^{2+} , (en el rango milimolar)⁷⁶, ya que los procesos de crecimiento y desarrollo se inhiben cuando disminuye su concentración⁷⁷. Ello se consigue gracias a sistemas de transporte eficientes en el consumo, almacenaje y translocación de este catión esencial⁷⁶. El Mg^{2+} obtenido por las plantas depende principalmente de la concentración que haya en el suelo⁷⁶. En las células vegetales, excepto un 5-10% que se une a la pectosa que forma parte de la pared celular, la mayoría del Mg^{2+} se transporta al interior celular, principalmente en forma de MgATP, o Mg-clorofila⁷⁶. En la célula, los cloroplastos⁷⁸, las mitocondrias⁷⁹ y las vacuolas contienen concentraciones de Mg^{2+} más altas que el citosol⁸⁰ (Fig.1.5.). Para intercambiar Mg^{2+} entre los diferentes

Introducción

compartimentos subcelulares es necesaria la presencia de transportadores especializados como los que describimos a continuación⁷⁶:

MGT

MGT (también denominada MRS2) representa la familia más estudiada de transportadores de Mg^{2+} en plantas⁷⁵. Esta familia ha sido identificada en diferentes especies y su actividad está relacionada con el crecimiento de raíces, la fotosíntesis en las hojas, el desarrollo del polen y la respuesta al estrés abiótico⁸¹⁻⁸⁶ (Fig.1.5). La familia MGT es homóloga del canal de Mg^{2+} bacteriano CorA, aunque también puede transportar Ni^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} y Cu^{2+} ⁷⁶. Su afinidad por Mg^{2+} es mucho más alta que por los otros cationes divalentes. La selectividad por el Mg^{2+} se debe a la presencia de un motivo conservado GMN también presente en CorA, que actúa de filtro en la entrada del poro⁸⁷.

AtCNGC10

AtCNGC10 es un canal de Mg^{2+} que fue identificado en las raíces de *Arabidopsis*, y pertenece a la familia de canales activados por nucleótidos cíclicos (CNGC por sus siglas en inglés "Cyclic Nucleotide Gated Channel")^{75,88}. Este canal media la entrada de Mg^{2+} en el meristemo⁸⁸ (Fig.1.5). A diferencia de los MGTs, su especificidad por Mg^{2+} no es alta y también transporta otros iones como K^+ , Ca^{2+} y H^+ ⁷⁶.

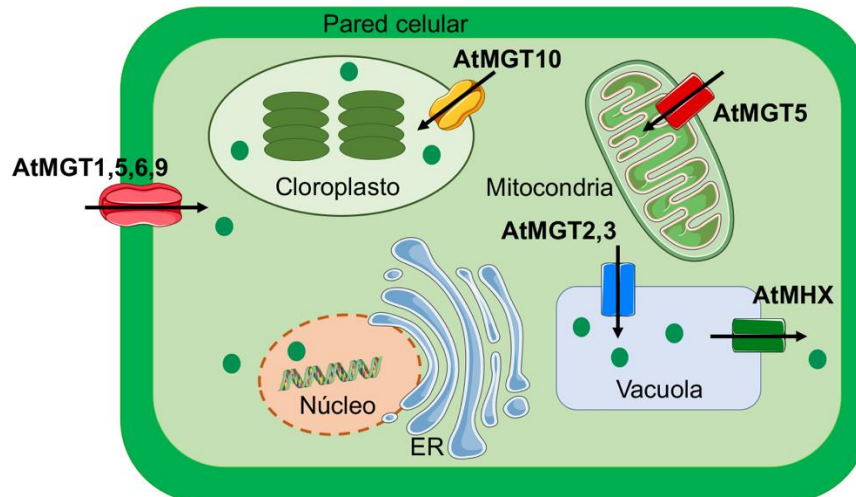


Figura 1.5. Transporte de Mg^{2+} en plantas. Figura adaptada de Zhi chang chen *et al.*⁷⁶. El Mg^{2+} en las plantas es necesario para diferentes funciones vitales y la mayoría se encuentra localizado en compartimentos subcelulares. Los miembros de la familia AtMGT1, 5, 6 y 9 median la entrada al interior celular. AtMGT10 introduce Mg^{2+} al cloroplasto donde es necesario que se una a la clorofila para realizar la fotosíntesis. AtMGT5 introduce Mg^{2+} en la mitocondria y los miembros AtMGT2 y 3 lo hacen a la vacuola. El intercambiador AtMHX parece que extrae Mg^{2+} de la vacuola.

MHX

MHX, identificado en el género *Arabidopsis* y considerado un intercambiador de Mg^{2+}/H^{+} es otro gen implicado en el transporte de Mg^{2+} ⁷⁵. Este transportador se encuentra altamente expresado en los epitelios vasculares de la planta, lo que sugiere un papel en la carga y recuperación del Mg^{2+} en el xilema (tejido vegetal lignificado de transporte en plantas vasculares)^{75,76} (Fig,1.5.).

1.3.2.2. Moléculas que median el transporte de Mg^{2+} en levaduras.

ALR1 y ALR2 son proteínas homólogas al canal bacteriano CorA⁸⁹. Fueron denominadas así porque cuando se sobreexpresan confieren resistencia al aluminio⁹⁰. De los dos miembros, ARL1 es el más estudiado, y aporta el principal mecanismo de entrada de Mg^{2+} en levaduras, aunque también media el eflujo de este catión. ARL1 se sobreexpresa cuando la concentración de Mg^{2+} extracelular disminuye y por el contrario, se degrada cuando las concentraciones de Mg^{2+} son elevadas⁹¹. La primera evidencia de que ALR1 y ALR2 transportan Mg^{2+} fue aportada en un estudio en el que se demostró que la sobreexpresión de ARL1 en oocitos de *Xenopus laevis*, permitía detectar corrientes dependientes de Mg^{2+} usando técnicas electrofisiológicas⁹². ALR1 y ALR2 también contienen el motivo GMN que hace de filtro selectivo para el Mg^{2+} en CorA. De hecho, la sustitución de la metionina del motivo por una leucina, inhibe completamente la capacidad de transporte de la proteína⁸⁹.

1.3.2.3. Homeostasis del Mg^{2+} en mamíferos.

El Mg^{2+} es el segundo catión más abundante en nuestras células después del potasio (K^{+})⁹³, y participa en funciones vitales como la neurotransmisión²¹, la conductancia cardíaca⁹⁴ y la regulación de la presión arterial⁹⁵. El adenosín-trifosfato (ATP), principal fuente de energía celular, requiere estar unido a Mg^{2+} para llevar a cabo su función biológica^{21,96,97}. Más de 600 enzimas dependen de la unión a Mg^{2+} o a MgATP para ser biológicamente activas^{98,99}, incluyendo aquellas que utilizan o sintetizan ATP, o las que interaccionan con otros nucleótidos para sintetizar ADN o ARN⁹⁸. El Mg^{2+} es también un catión esencial para la función de las ADN y ARN-Polimerasas,^{100,101} y es importante en los principales mecanismos de reparación del ADN^{97,102}. Otras enzimas que requieren Mg^{2+} son las topoisomerasas, helicasas, exonucleasas, kinasas, ciclasas, y diversos grupos de ATPasas. Es decir, el Mg^{2+} es un catión necesario en la replicación del ADN, la transcripción del ARN, y la traducción de proteínas²¹. También es un importante cofactor de enzimas implicadas en la glicolisis, ya que el MgATP es necesario para la

Introducción

actividad de hexoquinasas, fosfofructoquinasas, aldolasas, y piruvato kinasas^{103,104}. Sin embargo, el papel del este catión divalente va más allá de la replicación del ADN o de la glicolisis. Debido a que la actividad de todas las kinasas, guanilil ciclasas y adenilil ciclasas depende de MgATP, se ha postulado que el Mg²⁺ desempeña un papel esencial en cada proceso celular²¹. Además de su papel como cofactor enzimático, también es necesario en otras funciones celulares como por ejemplo la estabilización de las estructuras terciarias del ADN o del ARN¹⁰⁵ o la regulación de la contracción muscular, proceso en el que antagoniza con el ion calcio (Ca²⁺)⁹⁴. Como se ha mencionado en apartados anteriores, el magnesio es un nutriente mineral esencial. En la población general sana, su concentración en suero varía entre 0.7 y 1.1mM^{18,106}. Intracelularmente, la concentración de Mg²⁺ oscila entre 10 y 30mM dependiendo del tipo celular⁹³. Sin embargo, su concentración intracelular como ión libre es ligeramente inferior (0.5-1.2 mM), debido a que se encuentra mayoritariamente unido a ribosomas, polinucleótidos y ATP^{18,21,27,93,107}. Se estima que la dieta diaria de un adulto debe incluir entre 300 y 350 mg de Mg²⁺¹⁰⁶ y fuentes ricas en este nutriente mineral son las almendras, el cacao, las legumbres, las hortalizas de hoja verde y el pescado^{21,96}.

En el ser humano, la homeostasis del Mg²⁺ depende del papel coordinado del intestino, (responsable de la absorción gruesa del Mg²⁺ ingerido en la dieta), del hueso, (que almacena aproximadamente un 50-60% del Mg²⁺ total presente en el cuerpo) y del riñón, (que regula su excreción por la orina). Las fibras musculares también almacenan Mg²⁺, aunque en menor proporción¹⁰⁸. La absorción intestinal de Mg²⁺ y su posterior reabsorción renal, se produce a través de dos vías diferentes: La *(re)absorción paracelular*, que ocurre a través del espacio inter-celular del epitelio, y la *(re)absorción transcelular* (a través del citoplasma de las células epiteliales)¹⁰⁹. Ambos procesos requieren la intervención de canales y transportadores iónicos especializados⁹⁶ y se describen con más detalle en la sección 1.3.2.3.3 de esta memoria, dedicada a los transportadores de Mg²⁺ en humanos.

1.3.2.3.1. Absorción de Mg²⁺ en el intestino.

El intestino es capaz de absorber entre el 30 y el 50% de una ingesta diaria de Mg²⁺ de 350 mg, es decir, aproximadamente 100 mg²¹. Sin embargo, el proceso de absorción se adapta al consumo realizado. Algunos estudios muestran que este órgano puede llegar a absorber hasta el 80% del Mg²⁺ total ingerido cuando su contenido en la dieta es bajo²¹, reduciéndose significativamente a solo un 20% cuando la ingesta está muy

Introducción

enriquecida en el catión¹¹⁰⁻¹¹². En el intestino, la absorción de Mg^{2+} se realiza a través de dos vías diferentes:

(i) la vía paracelular, responsable de la absorción de aproximadamente el 90% del Mg^{2+} procedente de la dieta, tiene lugar esencialmente en el intestino delgado, donde el Mg^{2+} difunde de forma pasiva entre los enterocitos. Este proceso depende de un gradiente electroquímico transepitelial. Como la concentración de Mg^{2+} en el suero sanguíneo varía entre 0,7 y 1 mM aproximadamente, existe un gradiente químico de Mg^{2+} desde el lumen intestinal (el interior del tubo) hacia el exterior celular en contacto con la sangre^{21,27,96,112,113} (Fig. 1.6.)

(ii) La vía transcelular, tiene lugar en el intestino grueso (principalmente en el ciego y en el colon) y en ella, el Mg^{2+} se desplaza desde el lumen intestinal hasta los vasos sanguíneos que rodean el intestino, atravesando el enterocito^{21,23,113}. En este transporte, el Mg^{2+} que transcurre por el interior del intestino atraviesa en primer lugar la membrana apical (en contacto con el lumen intestinal) de las células epiteliales, y posteriormente atraviesa el citoplasma hasta alcanzar la membrana basolateral (en contacto con la sangre) de dichas células. Este complejo proceso, aún no bien comprendido, requiere de la actividad de canales apicales y de transportadores basolaterales de Mg^{2+} (cuya identidad, aunque ha sido postulada, no se conoce con certeza)^{96,112} (Fig 1.6.).

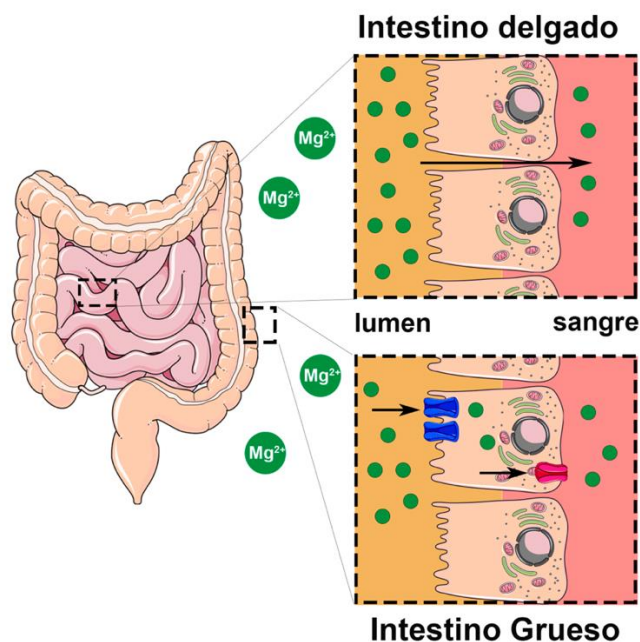


Figura 1.6. Absorción de Mg^{2+} en el intestino. (Izquierda) En el intestino la absorción de iones tiene lugar tanto en el intestino delgado como en el intestino grueso. (Derecha) El Mg^{2+} proveniente de la dieta, es absorbido en el intestino delgado de forma paracelular, a favor de gradiente electroquímico. En el intestino grueso, principalmente en el ciego y el colon, el Mg^{2+} se absorbe de forma transcelular, lo que requiere de la presencia de canales y transportadores de Mg^{2+} (representados en azul y magenta, respectivamente) localizados en la membrana apical (en contacto con el lumen del intestino), como en la membrana basolateral (en contacto con la sangre) del enterocito. Los cationes Mg^{2+} se representan con esferas verdes.

1.3.2.3.2. Reabsorción de Mg^{2+} en el riñón.

El riñón es el órgano encargado de filtrar la sangre y recuperar nutrientes, antes de que se produzca su excreción a través de la orina. Su unidad funcional, la nefrona, conecta a través de una estructura globular, el *glomérulo*, con los capilares sanguíneos que derivan de la arteria renal¹¹⁴. El glomérulo representa la puerta de entrada a la nefrona y filtra, aproximadamente, 2,400mg de Mg^{2+} diarios. También reabsorbe selectivamente agua, distintos iones, y pequeñas moléculas^{21,23}. La reabsorción renal de Mg^{2+} tiene lugar en tres regiones diferentes de la nefrona: (1) el túbulo contorneado proximal (PT); (2) la rama ascendente gruesa del asa de Henle (TAL); y (3) el túbulo contorneado distal (DCT) (Fig. 1.7.). Los mecanismos de reabsorción en el túbulo proximal no están muy estudiados, aunque se estima que reabsorbe un 10-25% del Mg^{2+} filtrado por el glomérulo mediante transporte pasivo²¹.

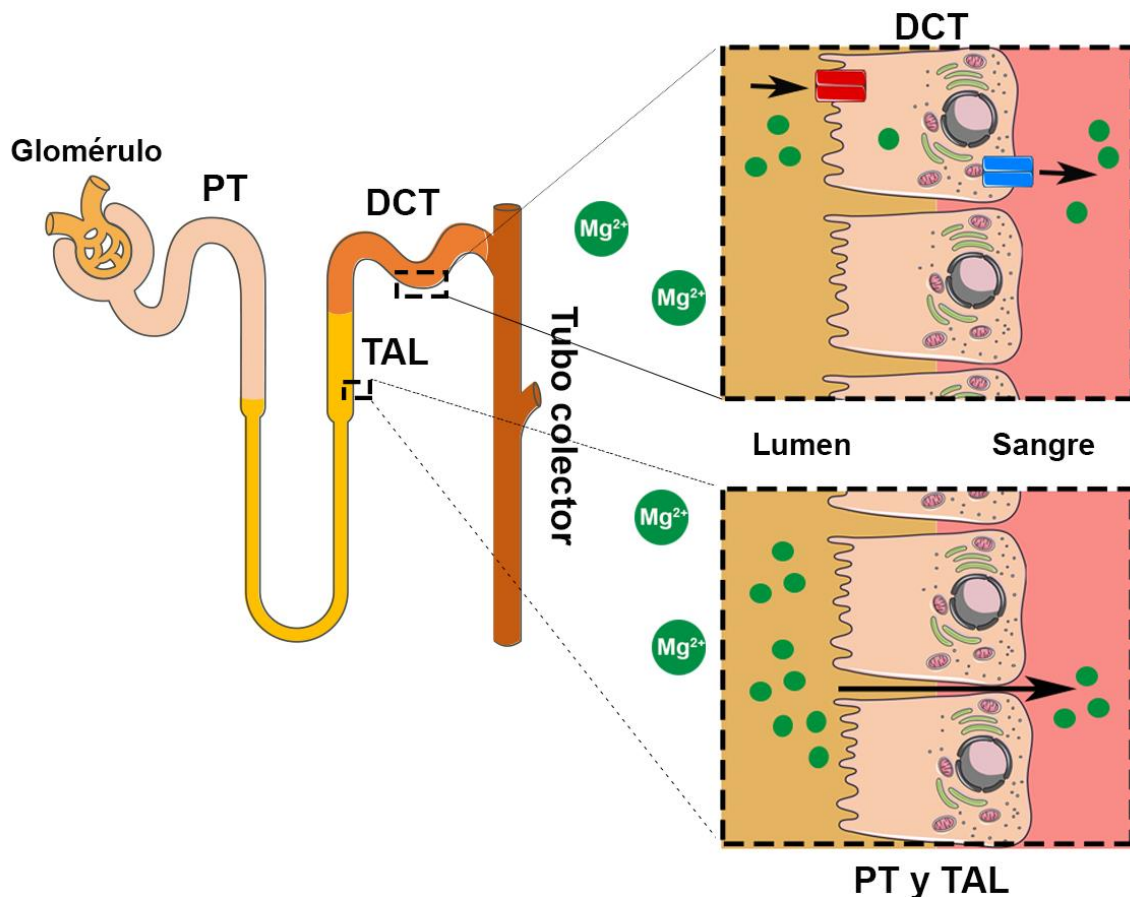


Figura 1.7. Reabsorción renal de Mg^{2+} . En el riñón, la reabsorción de iones tiene lugar en la nefrona (Izquierda). El Mg^{2+} se filtra a través del glomérulo, y entre un 10 y un 25% es reabsorbido en el túbulo contorneado proximal (PT), entre un 50 y un 70% se reabsorbe en la rama ascendente gruesa del asa de Henle (TAL) y aproximadamente el 10% se reabsorbe en el túbulo contorneado distal (DCT). (Derecha) En el PT y en el TAL la reabsorción de Mg^{2+} es mayoritariamente paracelular y ocurre a favor de gradiente. En el DCT la reabsorción de Mg^{2+} es transcelular y requiere de la presencia de proteínas especializadas (canales en rojo y transportadores en azul). Los cationes Mg^{2+} se representan en verde.

Introducción

La rama ascendente gruesa del asa de Henle (TAL) es el segmento donde tiene lugar la reabsorción principal de Mg^{2+} en la nefrona (50-70%)^{21,115}. En esta región, la reabsorción es mayoritariamente paracelular y depende de un gradiente electroquímico transepitelial y de la permeabilidad de las *uniones estrechas (tight junctions)*¹⁸ (Fig.1.7.), que son complejos de proteínas que forman puntos de adhesión entre células epiteliales adyacentes y evitan el libre paso de moléculas de un lado a otro^{116,117}. Estas proteínas ayudan a mantener la polaridad celular, ya que delimitan la región apical y la basolateral en una célula epitelial^{116,117}.

La región que sigue al TAL se denomina túbulo contorneado distal (DCT) y determina la concentración final de Mg^{2+} en la orina. El DCT es la última porción de la nefrona en la que se reabsorbe Mg^{2+} (un 10% del Mg^{2+} que se filtró por el glomérulo). A diferencia del TAL, la reabsorción de Mg^{2+} en el DCT es mayoritariamente transcelular, y está cuidadosamente regulado por proteínas especializadas, algunas de las cuales aún no han sido identificadas²¹ (Fig.1.7.).

1.3.2.3.3. Proteínas implicadas en el transporte de Mg^{2+} en mamíferos

En mamíferos se han identificado ocho familias de transportadores de Mg^{2+} (tabla 1.1.). Sin embargo, los mecanismos moleculares implicados en el transporte del ion Mg^{2+} siguen sujetos a debate.

TRPM6/7

TRPM6 y TRPM7 (por sus siglas en inglés “Transient receptor potential melastatin 6/7”) son canales iónicos permeables a cationes divalentes como Mg^{2+} , Zn^{2+} y Ca^{2+} ¹¹. Son únicos entre los canales iónicos ya que además actúan como proteínas kinasas (lo que se denomina “*Chanzyme*”)^{118–121}. Estas proteínas se asocian en homotetrámeros, o heterotetrámeros (si se asocia con TRPM6 para formar el complejo TRPM6/7), en los que cada subunidad contiene 6 hélices transmembranas, de las cuales, la 5 y la 6 contribuyen a la formación del poro. La región C-terminal se sitúa intracelularmente y contiene el dominio α -kinasa. Como chanzimas, su función también implica la proteólisis del dominio α -kinasa que se desplaza al núcleo y, mediante la fosforilación de histonas, regula la expresión génica^{122–124}. TRPM7 se expresa de forma ubicua^{26,84} mientras que TRPM6, cuya expresión depende de la disponibilidad de Mg^{2+} en la dieta, lo hace principalmente en el epitelio intestinal (colon) y en el DCT del riñón^{26,125}. Ambas están relacionadas con la (re)absorción de cationes divalentes en la membrana apical del DCT y del intestino grueso^{21,96}. En el intestino grueso se expresan en el lado luminal del enterocito, insertados en la membrana apical de las células del

Introducción

epitelio, y median la absorción transcelular de Mg^{2+} (Fig 1.6). En el DCT renal, TRPM6 media la entrada de Mg^{2+} a través de la membrana apical de la célula²¹ (Fig 1.7, 1.8.). Las mutaciones en TRPM6 causan hipomagnesemia con hipocalcemia secundaria (Código OMIM 602014). Los pacientes presentan malabsorción intestinal y pérdida renal de Mg^{2+} (Tabla 1.1.).

La estructura tridimensional de TRPM7, resuelta recientemente por criomicroscopía electrónica¹²⁷, muestra un tetramero que forma un poro central encargado del paso de iones. La selectividad de TRPM7 por cationes divalentes viene determinada por la presencia de un filtro selectivo formado por los carbonilos de una fenilalanina y una glicina y la cadena lateral de un glutamato (motivo FGE)¹²⁷. En el homólogo TRPM4, que es un canal de cationes monovalentes como el Na^{+} ¹²⁸, el motivo que selecciona los cationes es FGQ¹²⁷. Se ha demostrado que la mutación del glutamato del filtro selectivo por una glutamina en TRPM7, otorga a éste la capacidad de transportar cationes monovalentes¹²⁷.

Familia SLC41

SLC41A1, SLC41A2 y SLC41A3, de la familia de proteínas SLC41 (por sus siglas en inglés "Solute carrier family 41"), son homólogos lejanos del transportador de Mg^{2+} procariota MgtE¹²⁹ (Tabla 1.1.). Los tres miembros de la familia muestran un patrón de expresión ubicuo, aunque SLC41A3 es especialmente abundante en el DCT, lo que sugiere que puede tener un papel en la reabsorción renal de Mg^{2+} (Fig 1.7., tabla 1.1.) La familia SLC41A1-3 fue identificada por primera vez en un estudio realizado con oocitos de *Xenopus laevis*. SLC41A1 y SLC41A3 mostraron corrientes en condiciones fisiológicas de Mg^{2+} , que llevaron a postularlos como posibles canales de Mg^{2+} . En experimentos realizados con sondas fluorescentes se demostró que SLC41A1 extruía Mg^{2+} de forma dependiente de Na^{+} , es decir, es un intercambiador Na^{+}/Mg^{2+} . En un trabajo reciente, De Baaij y colaboradores¹³⁰ generaron un ratón KO de SLC41A3 que confirmó la implicación de esta proteína en la homeostasis del Mg^{2+} . Estos ratones presentaban hipomagnesemia y un aumento de los niveles de ARN mensajero de TRPM6 y SLC41A1 en el intestino¹³⁰. En este trabajo se sugirió que SLC41A3 podría tener un papel predominante en la reabsorción de Mg^{2+} en el DCT¹³⁰ (Fig 1.8.). Otro estudio del mismo año, sugirió que SLC41A3 podría facilitar la extrusión de Mg^{2+} en la membrana interna mitocondrial regulando así la homeostasis energética²⁸. Por tanto, solo regularía la reabsorción renal de Mg^{2+} de forma indirecta, lo que podría explicar por qué el ratón SLC41A3 KO del artículo publicado por De baaij *et al.* no exhibió pérdida de Mg^{2+} por la orina^{26,130}.

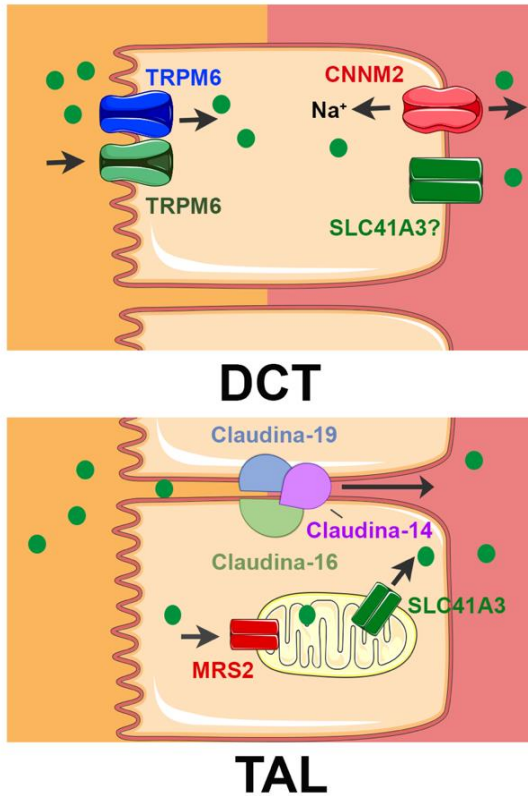


Figura. 1.8. Representación esquemática de las proteínas implicadas en la reabsorción renal de Mg²⁺. En el DCT, TRPM6/7 son los canales encargados de introducir Mg²⁺ desde el lumen de la nefrona hacia el interior del DCT. La proteína implicada en la extrusión del Mg²⁺ a la sangre desde el compartimento basolateral se ha propuesto que sea CNNM2 o SLC41A3, CNNM2 parece que intercambia el Mg²⁺ por 2Na⁺. En el TAL la absorción de Mg²⁺ es transcelular y está regulada por las claudinas presentes en las uniones estrechas entre las células del epitelio renal. En la mitocondria la entrada de Mg²⁺ se realiza a través de MRS2 y la extrusión parece que es mediada a través de SLC41A3. Los cationes Mg²⁺ se representan como esferas verdes. El lado luminal o apical está coloreado de naranja, y el compartimento basolateral o la sangre, en rojo

Transportador de Magnesio subtipo 1 (MagT1)

MagT1 (por sus siglas en inglés "*Mg²⁺ transporter subtype 1*") es otra proteína que se relacionó con el transporte de Mg²⁺ tras observar que si se inhibía su expresión en células de mamífero los niveles de Mg²⁺ intracelular disminuían¹³³. Algunos autores han propuesto que MagT1 es un transportador que media la entrada de Mg²⁺ de forma rápida en la célula, aunque se desconoce el mecanismo por el que actúa^{26,133} (Tabla 1.1.). Una de las pocas cosas que se sabe es que MagT1 forma parte del complejo transferasa de oligosacáridos, el cual actúa en la ruta de N-glicosilación en el retículo endoplasmático¹³⁴. Está ampliamente descrito que la glicosilación participa en el tráfico y estabilización de proteínas transportadoras y canales a la membrana plasmática¹³⁵. Actualmente se piensa que MagT1 regula la entrada de Mg²⁺ ya que regula la correcta localización de los transportadores de Mg²⁺ en la membrana plasmática a través de la glicosilación de los mismos²⁶ (Tabla 1.1.).

MRS2 (Mitochondrial RNA splicing 2)

MRS2 es un homólogo del canal de Mg²⁺ bacteriano CorA y del canal presente en levaduras ARL1^{11,26}. MRS2 fue uno de los primeros transportadores de Mg²⁺ identificados molecularmente¹³⁶ y ha sido estudiado principalmente en levaduras. MRS2 constituye un canal primario de Mg²⁺ en la mitocondria, ya que su expresión se relaciona

Introducción

directamente con la entrada de Mg^{2+} ²⁹ (Fig 1.8, Tabla 1.1.). En células HEK293, la eliminación de MRS2 conduce a una disminución del Mg^{2+} presente en las mitocondrias, y posteriormente, a la muerte celular¹³⁷. Ello sugiere que MRS2 es esencial para el metabolismo del Mg^{2+} en las mitocondrias²⁶.

Otros factores homeostáticos del Mg^{2+} en mamíferos: NIPA, MMgT y ATP13A4

Las proteínas mencionadas en este apartado son proteínas que en algún estudio han sido relacionadas con el transporte de Mg^{2+} en células de mamífero. Sin embargo, su actividad como transportadores o canales no ha sido probada.

Las proteínas **NIPA** (por sus siglas en inglés “Nonimprinted in Prader-Willi/Angelman síndrome”) es considerada una familia de transportadores de Mg^{2+} directos^{138,139}, aunque no hay ningún estudio sobre la cinética o selectividad por iones de este posible transportador²⁶. Pacientes con mutaciones en NIPA2 presentan deficiencia de Mg^{2+} en neuronas¹⁴⁰ (Tabla 1.1.).

MMgT1 y **MMgT2** (por sus siglas en inglés “Membrane magnesium transporter 1 y 2”) son dos proteínas que también se han relacionado con el transporte de Mg^{2+} ²⁴. Como son proteínas que solo contienen un dominio transmembrana se piensa que participan como subunidades de otros canales y no como transportadores por si mismos²⁶ (Tabla 1.1.).

ATP13A4 es un miembro de la subfamilia de las ATPasas tipo P5 que ha sido asociado con la regulación de Ca^{2+} y de Mg^{2+} en ratones^{141,142}(Tabla 1.1.). A día de hoy no es una proteína bien caracterizada y no hay evidencias sobre sus sustratos específicos²³.

Claudinas

Las claudinas son una familia de 24 proteínas^{21,96,116,143,144}, que permiten que las uniones estrechas actúen de barrera, o de canal. La función de barrera permite a las uniones estrechas (*Tight junctions*) situadas entre las células epiteliales aumentar la resistencia eléctrica transepitelial donde sea necesario^{96,145}. La función de canal es vital para el transporte de iones como el Mg^{2+} o el Ca^{2+} , o la absorción de agua y es dependiente de la existencia de un gradiente electroquímico¹¹⁷. Aunque las uniones estrechas no contienen proteínas que actúen de bombas o transportadores directos, el transporte a través de ellas puede ser regulado mediante variaciones en la composición

Introducción

de proteínas¹⁴³. Por tanto, la expresión de diferentes claudinas en los diferentes epitelios puede regular la reabsorción de Mg^{2+} ¹¹⁶.

En el TAL se expresan las claudinas 3, 10, 11, 14, 16 y 19. La 16 y la 19 se consideran las claudinas principales en la permeabilidad al Mg^{2+} , ya que mutaciones en estas proteínas conllevan pérdida de Mg^{2+} a través de la orina^{21,96,142}. Ambas, Claudina 16 y 19 necesitan interactuar entre sí para su correcta inserción en la unión estrecha y ser funcionalmente activas²¹ (Fig 1.8.). La Claudina 14 reduce la especificidad de barrera en las uniones estrechas cuando se coexpresa con la Claudina 16 o con el complejo Claudina 16/19, y actúa como un bloqueador inespecífico de cationes^{146,147} (Fig 1.8.). Finalmente, la Claudina 10 desarrolla un importante papel en la selectividad de cationes en el TAL¹⁴⁸. Este hecho se demostró utilizando un modelo de ratón al que se le había eliminado la Claudina 10 de forma selectiva solo en el TAL de la nefrona¹⁴⁸. Estos ratones presentaron hipermagnesemia, nefrocalcinosis y se observó menor permeabilidad al Na^+ . En ausencia de la Claudina 10 las uniones estrechas presentan mayor permeabilidad al Mg^{2+} y al Ca^{2+} ¹⁴⁸.

Introducción

Tabla 1.1. Transportadores de Mg²⁺ en mamíferos.

Proteína	Proteínas homólogas	Expresión en tejido	Expresión subcelular	Enfermedades asociadas (OMIM)	Función	Referencias seleccionadas
TRPM	--					
TRPM6		Riñón/colon	Membrana plasmática	602014	Entrada Mg ²⁺	126,149,150
TRPM7		Ubicuo	Membrana plasmática	105500	Entrada Mg ²⁺	151,152
CNNMs	<i>CorB/ CorC/ SA0657/ Mam3p</i>					40,153,154
CNNM1		Cerebro, testículo	Membrana plasmática		Eflujo Mg ²⁺	153,155
CNNM2		Riñón	Membrana plasmática	613882/616418	Entrada/Eflujo Mg ²⁺	155-157
CNNM3		Riñón, cerebro, pulmones	Membrana plasmática		Entrada Mg ²⁺	155,158
CNNM4		Colon	Membrana plasmática	217080	Eflujo Mg ²⁺	155,159,160
SLC41	<i>MgtE/OtMgtE</i>					161
SLC41A1		Ubicuo	Membrana plasmática		Eflujo Mg ²⁺	152,162
SLC41A2		Ubicuo	Membrana plasmática		¿?	163
SLC41A3		Ubicuo	Mitocondria		Eflujo Mg ²⁺ mitocondrial	28,130
MRS2	<i>CorA/ALR1-2/MGT</i>	Ubicuo	Mitocondria		Influjo Mg ²⁺ mitocondrial	11,29,137,164
MagT1		Ubicuo	R.E/ Membrana plasmática	300853	Glicolisis	134,165,166
NIPA	--					
NIPA1		Cerebro	Membrana plasmática	600336	¿?	138,167
NIPA2		Ubicuo	Membrana plasmática	600131	¿?	140
NIPA3		Ubicuo	Membrana plasmática		¿?	24
NIPA4		Ubicuo	Membrana plasmática	612281	¿?	24
MMgT	--					
MMgT1		Ubicua	Golgi		Anclaje a membrana	24
MMgT2		Ubicua	Golgi		Anclaje a membrana	24
ATP13A4	--	Cerebro	Membrana plasmática		¿?	141,168

En la columna de proteínas homólogas, las que pertenecen a bacterias se representan en color azul, las pertenecientes a levaduras en rojo, en rosa se presentan proteínas pertenecientes a algas y en color verde proteínas de plantas. Mam3p es una proteína relacionada con la toxicidad al Mn²⁺ en levaduras perteneciente a la familia ACP⁵⁴. OtMgtE es una proteína relacionada con el transporte de Mg²⁺ en el alga verde unicelular *Ostreococcus tauri*¹⁶¹. CorA, CorB, CorC, MgtE y SA0657 se explican en detalle en el apartado 1.3.1.1. MGT se explica en detalle en el apartado 1.3.2.1.

1.4. FACTORES HOMEOSTÁTICOS CNNM.

Una de las familias menos estudiadas e intrigantes implicadas en la regulación de la homeostasis del Mg^{2+} es la denominada “Cyclin and CBS domain divalent metal cation transport mediators family” (CNNMs), descubierta en 2003 por Wang y colaboradores¹⁵³. En mamíferos, incluye cuatro miembros (CNNM1-CNNM4), que inicialmente se consideraron localizados en el núcleo celular¹⁵³. El alineamiento de la secuencia de nucleótidos de los genes que codifican las CNNMs muestra la presencia de una región conservada, con una homología de aproximadamente un 60%. A nivel de aminoácidos, se observó que la similitud en esta región aumentaba hasta aproximadamente hasta un 90% entre algunos de sus miembros¹⁵³. Esta región altamente conservada fue denominada “*Ancient Conserved Domain*” o ACD por los autores de este estudio¹⁵³, lo que llevó a nombrarlas originalmente como “*Ancient Conserved Domain Proteins*” (ACDPs). La región conservada se sitúa entre los residuos 425-803, 442-718, 310-590 y 369-644 de las proteínas CNNM1-4, respectivamente (Fig.1.9). La presencia del dominio ACD pudo identificarse adicionalmente en organismos filogenéticamente distantes, como bacterias, levaduras, insectos y mamíferos¹⁵³. Además del ACD, también se identificó otra región conservada similar a la denominada “Cyclin box” de otras proteínas¹⁶⁹. Este motivo permite a las proteínas con actividad ciclina unirse a sus correspondientes proteínas kinasa dependientes de ciclina (CDKs)¹⁷⁰. La presencia de la “cyclin box”, la atribución de una localización nuclear, y la homología de estas proteínas con las ciclinas, condujo inicialmente a considerar a las ACDPs como proteínas relacionadas con el ciclo celular¹⁵³. Sin embargo, esta función nunca se ha confirmado¹⁷¹. Un estudio posterior, de los mismos autores¹⁷² permitió localizar ACDP1 en la membrana plasmática (y no en el núcleo). Ello llevó a sus descubridores a proponer que los CNNMs podrían ser proteínas relacionadas con el transporte de iones metálicos¹⁷².

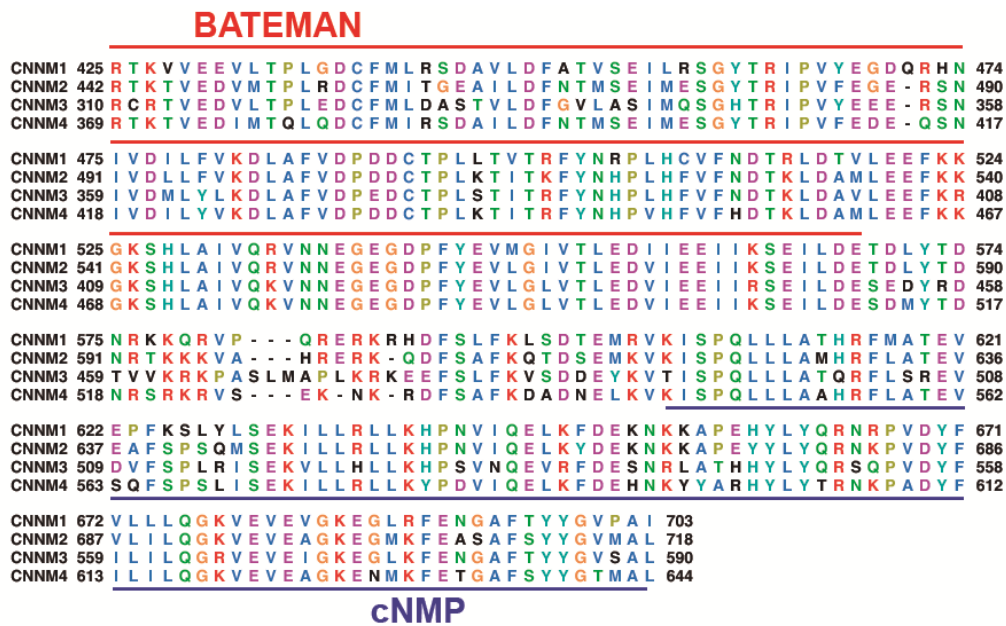


Fig 1.9. Alineamiento de la región conservada ACD de los cuatro CNNMs. El ACD (“Ancient Conserved Domain”) es una región altamente conservada entre los cuatro miembros de la familia y que comprende el módulo Bateman (rojo) y el dominio cNMP salvo los últimos 100 residuos (azul).

La distribución en tejidos y el patrón de expresión de los CNNMs, es divergente (<https://www.proteinatlas.org/>). CNNM1 se encuentra principalmente en testículos y cerebro, aunque también se han detectado niveles de expresión más bajos en estómago, riñón, músculo esquelético, corazón, pulmones, hígado, intestino delgado, colon y bazo^{173,174}(Tabla 1.2.). En los testículos, su expresión se limita a células positivas a c-KIT y OCT3/4, que son células espermatozógenas. Este hallazgo sugiere un posible papel como regulador de la división y diferenciación de células germinales¹⁷³. CNNM2, el miembro más estudiado de la familia, es ubicuo, aunque se expresa mayoritariamente en el cerebro, riñón, hígado y corazón^{24,153,171,175}(Tabla 1.2.). También se han detectado niveles bajos de expresión en odontoblastos, intestino delgado y colon¹⁷⁵. Algunos estudios han reportado niveles de expresión bajos de CNNM2 en la rama ascendente gruesa del asa de Henle (TAL), y en el túbulo de conexión (CNT)¹⁵⁶, lo que sugiere un papel en la reabsorción renal paracelular de Mg²⁺¹⁷⁶. CNNM3 también es ubicua, pero se expresa mayoritariamente en los pulmones, el bazo y el corazón^{153,171}, y débilmente, en el músculo esquelético¹⁵³ y los Odontoblastos (Tabla 1.2.). Por último, CNNM4 es muy abundante en el tracto intestinal^{159,160}, en ameloblastos maduros¹⁵⁹, odontoblastos y en el espermatozoo¹⁷⁷ (Tabla 1.2.).

Introducción

Tabla 1.2. Distribución por tejidos de las CNNMs. Niveles altos de expresión se muestran en negrita.

PROTEÍNA	LOCALIZACIÓN	REFERENCIAS
CNNM1	Estómago, riñón, músculo esquelético, corazón, pulmones, hígado, colon, bazo, intestino delgado, cerebro y testículo	26,153,171,174,178,179
CNNM2	Odontoblastos, intestino delgado, colon, riñón, pulmones, bazo, testículo, cerebro, hígado y corazón.	107,153,172,174,175,178-180
CNNM3	Odontoblastos, músculo esquelético, riñón, cerebro, pulmones, bazo, corazón, hígado.	24,153,172,174,178-180
CNNM4	Odontoblastos, colon, ameloblastos maduros, esperma, tracto digestivo.	158-160,172,174,179,180

En consistencia con su distribución ubicua pero diferencial en los mamíferos, la disfunción de los cuatro CNNMs está relacionada con el desarrollo de diferentes patologías relacionadas con el gasto de Mg^{2+} en diferentes órganos y tejidos¹⁸¹. Mutaciones en CNNM2 causan hipomagnesemia familiar con normocalciuria y normocalcemia (Código OMIM 613882), una enfermedad hereditaria recesiva, cuyos síntomas clínicos son debilidad en las extremidades, vértigo, dolores de cabeza, convulsiones, y retraso psicomotor medio-moderado^{108,156,182}(Tabla 1.3.). La disfunción en la actividad de CNNM2 también ha sido relacionada con retraso mental y desórdenes neuropsiquiátricos, como la esquizofrenia¹⁸³⁻¹⁸⁵, así como con anomalías en el desarrollo del cerebro. De hecho, la delección de CNNM2 es letal en embriones de ratones¹⁸⁶. Ratones heterocigotos *Cnnm2*^{+/-} presentan también menor presión arterial¹⁸⁶. Estudios adicionales han relacionado CNNM2 con diabetes, obesidad e infertilidad^{155,187}.

Mutaciones en CNNM4 causan una enfermedad hereditaria rara denominada Síndrome de Jalili (JS), que se manifiesta clínicamente con *amelogénesis imperfecta* (formación anormal del esmalte dental que conlleva la decoloración, debilidad y disminución del tamaño de los dientes, que además son quebradizos¹⁸⁸) y *distrofia de conos y bastones* (células fotosensibles y fotorreceptoras de la retina^{189,190}). Desde el descubrimiento de este síndrome en 1988¹⁹¹ se han descrito dieciséis mutaciones en CNNM4 en pacientes con esta enfermedad (Tabla 1.3.).

Introducción

Tabla 1.3. Mutaciones patológicas descritas en CNNMs identificadas en pacientes

PROTEÍNA	MUTACIÓN	DOMINIO	PATOLOGÍA	REFERENCIAS
CNNM2	R38Q, E122K	Extracelular	Hipomagnesemia	156,157
	S269W, L330F, E357K	DUF21	Hipomagnesemia	157
	T568I	Módulo Bateman	Hipomagnesemia	24
CNNM4	D63E	Extracelular	Síndrome de Jalili	192
	S196P, S200Y, I232P, R236Q, L324P	DUF21	Síndrome de Jalili	190,193,194
	G364V, G492C, L438P, T495I, V499M	Módulo Bateman	Síndrome de Jalili	193–196
	R519X	Conexión Bateman- cNMP	Síndrome de Jalili	197
	N594S, Q564X, R605X, T581*	cNMP	Síndrome de Jalili	190,198,199

La función biológica de los CNNMs ha sido objeto de numerosos estudios desde su descubrimiento y sigue siendo objeto de debate actualmente^{24,153,157,159,171,175,186,200,201}. De los cuatro miembros de la familia, CNNM2 es el más estudiado, y también es el que más debate suscita. Goytain and Quamme, en 2005¹⁷⁵, observaron que el contenido de Mg^{2+} en la dieta afectaba a la expresión de CNNM2. En concreto, una reducción del contenido de este catión en la dieta de ratones iba asociada a un incremento en la expresión de CNNM2 en el riñón¹⁷⁵. Además, la sobreexpresión de CNNM2 en oocitos de *Xenopus laevis*, permitió observar corrientes de Mg^{2+} , y de otros cationes divalentes como Co^{2+} , Mn^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Cu^{2+} y Fe^{2+} ¹⁷⁵. Teniendo en cuenta que los niveles de expresión de CNNM2 se ven afectados por la presencia de Mg^{2+} en la dieta de los ratones, y que la K_m (la concentración del ión a la cual se alcanza la conductancia máxima^{7,175}) solo se encuentra en el rango de concentración fisiológica en el caso del Mg^{2+} , los autores concluyeron que, a pesar de que la proteína puede mediar el transporte de otros cationes, actúa principalmente como un transportador de Mg^{2+} . Este resultado fue apoyado posteriormente por Sponder y colaboradores²⁰¹, tras observar que la sobreexpresión de CNNM2 humano en la cepa de *Salmonella enterica* MM281 compensaba parcialmente la carencia intrínseca de la maquinaria molecular de transporte de Mg^{2+} (CorA, MgtA y MgtB) que caracterizaba a esta cepa, y permitía el crecimiento²⁰¹ (apartado 1.3.1.1.). Otra evidencia de la implicación de CNNM2 en el transporte de Mg^{2+} , proviene de la identificación de dos mutaciones en CNNM2 que causan *hipomagnesemia familiar dominante* (Código OMIM 616418), una enfermedad rara caracterizada por niveles bajos de Mg^{2+} en sangre¹⁵⁶. Esta deficiencia se atribuyó a un fallo en la reabsorción en las células del DCT del riñón¹⁵⁶, que son las encargadas de regular la concentración final de Mg^{2+} en el suero sanguíneo, y en las que CNNM2

Introducción

se expresa mayoritariamente^{156,171}. La caracterización electrofisiológica de CNNM2, sobreexpresada en células HEK293, produjo corrientes de Mg^{2+} dependientes de Na^{+156} (Fig 1.8.). Este resultado fue reproducido en otro trabajo independiente¹⁵⁹. El aumento de la concentración intracelular de Mg^{2+} al sobreexpresar CNNM2 en células HEK293 también fue observado en un trabajo llevado a cabo por Arjona *et al*¹⁵⁷. Sin embargo, estos autores observaron que el efecto se anulaba al aplicar un inhibidor del canal TRPM7 denominado 2APB. Los autores concluyeron que CNNM2 ejercía probablemente un papel regulador sobre la permeabilidad de TRPM7 al Mg^{2+} ¹⁵⁷. En contraposición, un trabajo llevado a cabo por Hirata y colaboradores¹⁵⁵, en el que se empleaba un indicador de Mg^{2+} (*Magnesium Green*) permitió observar una rápida extrusión de Mg^{2+} (en un ratio temporal de segundos) ligado a la sobreexpresión de CNNM2 en células HEK293¹⁵⁵. Este mismo grupo, liderado por Miki Hiroaki, investigó la función de CNNM2 en un modelo animal. Ratones *Cnnm2*^{-/-} resultaron tener un fenotipo letal en los embriones, mientras que el heterocigoto *Cnnm2*^{+/-} fue viable, y presentaba dificultades en la reabsorción de Mg^{2+} , además de niveles bajos de Mg^{2+} en suero¹⁸⁶. El mismo fenotipo fue observado en ratones con una delección específica de CNNM2 en el riñón¹⁸⁶. Por último, Sponder y colaboradores utilizaron un marcador fluorescente, *Mag-fura-2*, sensible al Mg^{2+} , en un modelo *in vitro*, para investigar la actividad de transporte de Mg^{2+} de CNNM2 humano, en condiciones que favorecerían tanto la intrusión como la extrusión de Mg^{2+} ²⁰⁰. Aunque se utilizó el mismo sistema de expresión que en los estudios anteriores, (células HEK293), no detectaron transporte directo de Mg^{2+} . Los autores postularon que CNNM2 actúa como un factor homeostático de Mg^{2+} y no como un transportador directo en sí mismo²⁰⁰.

En conclusión, a pesar de conocer la inequívoca implicación de CNNM2 en la homeostasis del Mg^{2+} , avalada por el efecto de mutaciones identificadas en pacientes hipomagnesémicos, y por experimentos “*knockdown*” en ratones, la función exacta de esta proteína sigue siendo una incógnita.

La primera evidencia de la implicación del cuarto miembro de la familia, CNNM4, en la homeostasis de Mg^{2+} en ratones, fue aportada por el grupo de Miki Hiroaki¹⁵⁹. CNNM4 se expresa mayoritariamente en el intestino, donde se localiza en la membrana basolateral (Tabla 1.2.) y su expresión en el riñón es minoritaria^{172,180,202}. Miki *et al* observaron que la sobreexpresión de CNNM4 en células HEK293, media una rápida extrusión de Mg^{2+} que es dependiente de la presencia de Na^{+} extracelular¹⁵⁹. Estos datos llevó a los autores a postular que CNNM4 extruye Mg^{2+} intercambiándolo con Na^{+} a través de la membrana basolateral de las células del epitelio intestinal. Además, actúa

Introducción

de forma complementaria al mecanismo de absorción llevado a cabo por los canales TRPM6/7, situados en la membrana apical del enterocito^{159,160}. Se observó que ratones KO *Cnnm4*^{-/-} presentaban niveles de Mg^{2+} en sangre significativamente inferiores a los de ratones control, lo que apoya el papel de CNNM4 en la absorción intestinal de Mg^{2+} ¹⁵⁹. Por otro lado, ratones machos con deficiencia en *Cnnm4* son infértiles y el esperma presenta niveles más altos de Mg^{2+} intracelular. Además, la función del canal de Ca^{2+} *CatSper* se encuentra inhibida²⁰³. Este resultado es el primero que sugiere una relación funcional entre la actividad de los CNNMs y la señalización por Ca^{2+} ^{177,204}. De acuerdo a estos resultados, en una publicación reciente se reportó que ratones *Cnnm4*^{-/-} presentaban un fenotipo similar a ratones deficientes en el canal TRPV1²⁰⁵. TRPV1 es un canal de Ca^{2+} ²⁰⁶, y la entrada de Ca^{2+} a través de ese canal se encuentra inhibida en ratones deficientes de CNNM4²⁰⁵. Este estudio estableció una relación funcional entre Mg^{2+} y Ca^{2+} en el epitelio intestinal²⁰⁵.

CNNM1 y CNNM3 son los miembros menos estudiados de la familia, y el conocimiento acerca de su función sigue siendo muy limitado, ya que no hay estudios sobre su actividad. Un estudio sobre el pez globo *Takifugu obscurus*, demostró que CNNM3 se encontraba sobreexpresado en el riñón cuando los animales se mantenían en agua salada²⁰⁷. Un análisis inmunohistoquímico reveló que CNNM3 se expresaba en el túbulo proximal, y se encontraba localizado en la membrana lateral. La expresión de CNNM3 en oocitos de *Xenopus laevis* se tradujo en una reducción significativa de la concentración de Mg^{2+} intracelular²⁰⁷. El único estudio existente hasta la fecha en un modelo de mamífero fue realizado en el laboratorio de Miki¹⁵⁵, en el que se expresaron los cuatro miembros de la familia CNNM en células HEK293, y utilizaron *Magnesium Green* para la detección de Mg^{2+} ¹⁵⁵. Este trabajo solo permitió detectar una débil extrusión de Mg^{2+} en células tras sobreexpresar CNNM1. No se observó actividad en células en las que se sobreexpresó CNNM3¹⁵⁵.

1.4.1. Estructura tridimensional de los factores homeostáticos CNNMs.

Estructuralmente, los CNNMs son proteínas modulares complejas que contienen cuatro dominios independientes conectados por regiones de diferente longitud¹⁸¹. La región N-terminal es extracelular y comparte la similitud de secuencia más baja ($\approx 19\%$) entre los cuatro miembros de la familia. Esta región contiene una α -hélice transmembrana seguida de una región potencialmente rica en láminas β ¹⁸¹. También incluye un péptido señal largo (que en CNNM2 contiene 64 aminoácidos) que es reconocido por el complejo de la peptidasa señal (SPC, un complejo de proteínas

Introducción

expresado en el retículo endoplásmico, que se encuentra relacionado con el corte de péptidos señales²⁰⁸) que lo proteoliza¹⁷¹. La región N-terminal de los CNNMs también presenta una asparagina conservada (N112, N73 y N85 en CNNM2, CNNM3 y CNNM4 respectivamente) que representa el sitio de glicosilación necesario para la localización final de la proteína en la membrana plasmática¹⁷¹. A continuación de la región extracelular, se encuentra un dominio transmembrana, denominado DUF21 (Código PFAM PF01595), del cual no se conoce prácticamente nada aparte de su composición de aminoácidos y que está presente también en las proteínas relacionadas con el transporte de Mg^{2+} CorB y SA0657^{37,40} (apartados 1.3.1.1.). En CNNMs humanos, se predice que el dominio DUF21 contiene cuatro hélices transmembrana, de las cuales una es muy corta¹⁷¹. En 2012, de Baaij y colaboradores, realizaron un estudio¹⁷¹ marcando la proteína CNNM2 con diferentes epítomos, con el objetivo de determinar si la región situada a continuación del DUF21 se localizaba intra- o extracelularmente¹⁷¹. En este estudio, los autores demostraron que el dominio situado en la región N-terminal se sitúa extracelularmente, mientras que para detectar epítomos situados en la región C-terminal, fue necesario permeabilizar la célula, lo cual demostraba que esa región se situaba en la región intracelular¹⁷¹. La similitud en secuencia de aminoácidos en el DUF21 es cercana al 45% , siendo más alta entre CNNM2 y CNNM4 (79%). Si esas diferencias confieren algún tipo de selectividad por iones o algún tipo de mecanismo de transporte específico para cada CNNM, todavía tiene que elucidarse¹⁸¹.

El segmento polipeptídico que sigue al dominio DUF21 se corresponde con la región citosólica de los CNNMs e incluye dos dominios diferentes. El primero, denominado *módulo Bateman* está formado por dos motivos cistationina β -sintasa (CBS1, CBS2) situados de manera consecutiva en la secuencia⁶⁵ (Fig.1.10 y 1.11.). El módulo Bateman representa la región más conservada entre los CNNMs (\approx 78% de media y un 90% entre CNNM2 y CNNM4). Una hélice α (H0) larga precede al motivo CBS1 y une el módulo Bateman con el dominio DUF21, de tal manera que permite la comunicación directa entre la región citosólica y la transmembrana.

Introducción

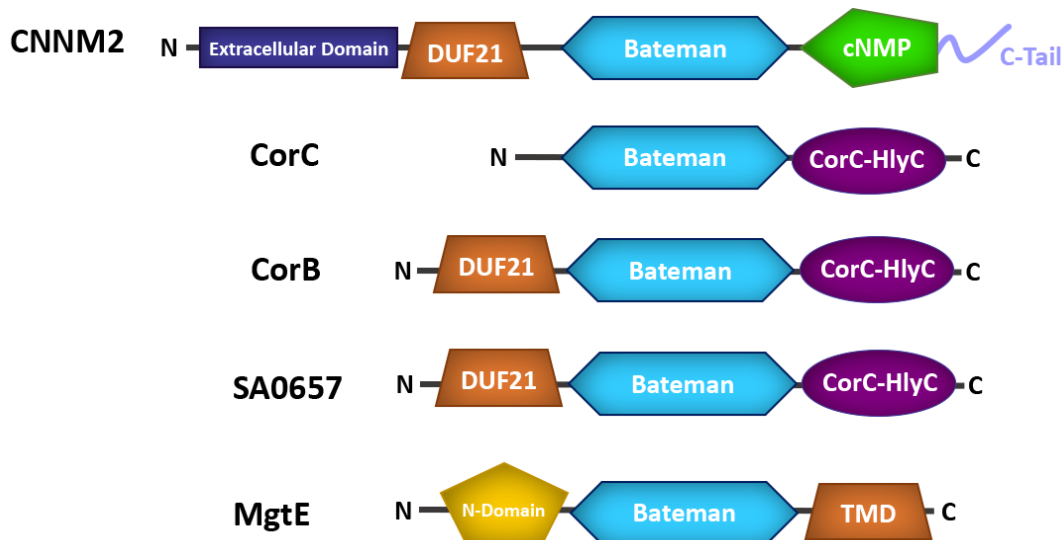


Figura 1.10. Distribución por dominios de proteínas similares a los CNNMS relacionadas con el transporte de Mg^{2+} . CNNM2 comparte con CorB y con SA0657 la presencia de un dominio DUF21 y un módulo Bateman. CorC, a pesar de que no posee el dominio DUF21, también presenta un dominio regulador formado por motivos CBS y tiene homología con los CNNMs¹⁵³. MgtE es uno de los canales de Mg^{2+} principales en bacterias que también se regula por un módulo Bateman y contiene una región transmembrana (TMD). CorB, CorC y SA0657 contienen el dominio CorC-HlyC mientras que las CNNMs contienen un dominio cNMP. La región intracelular de MgtE contiene un dominio N-terminal denominado dominio N.

La distribución de dominios de los CNNMs, es muy similar a la de otras proteínas relacionadas con el transporte de Mg^{2+} en bacterias, como CorB, CorC y los recientemente identificados como factores de tolerancia al Mg^{2+} en *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhimurium* SA0657, SA0780 y StCorB respectivamente^{40,172}. Además, también comparten con MgtE la presencia de dominios CBS (Fig1.10.).

La estructura del módulo Bateman de CNNM2 fue resuelta en el año 2014 por Corral-Rodríguez y colaboradores²⁰⁹. La estructura tridimensional del módulo Bateman de CNNM2, tiene una apariencia similar al de una alubia, donde cada extremo está ocupado por un motivo CBS¹⁸¹ (Fig 1.11). Cada motivo CBS se encuentra a su vez formado por tres láminas β , y dos hélices α , empaquetadas de acuerdo a la secuencia $\beta 1-\alpha 1-\beta 2-\beta 3-\alpha 2$ junto con una región de conexión flexible que precede a la primera lámina β ^{65,67,70,209}. La región central del módulo Bateman presenta dos cavidades situadas de forma simétrica a cada uno de sus lados, denominadas S1 y S2, cuyas paredes laterales y traseras se encuentran formadas por las hojas β de los motivos CBS^{181,209} (Fig 1.11). Estas cavidades, suelen unir nucleótidos derivados de adenina en otras proteínas que contienen dominios CBS, como MgtE (que une ATP en el S1)⁶⁹ o la proteína quinasa AMPK (que une nucleótidos en S1 y S2)²¹⁰.

Siguiendo el patrón de asociación más comúnmente observado en proteínas que contienen dominios CBS, el módulo Bateman de las CNNMs se asocia consigo mismo

Introducción

formando un dímero simétrico en forma de disco. Esta asociación dimérica es conocida como “*módulo CBS*”⁶⁶ (Fig 1.11). En los CNNMs, el módulo CBS es paralelo (tiene los extremos N y C-terminal de subunidades complementarias orientados hacia el mismo lado)^{65,67}.

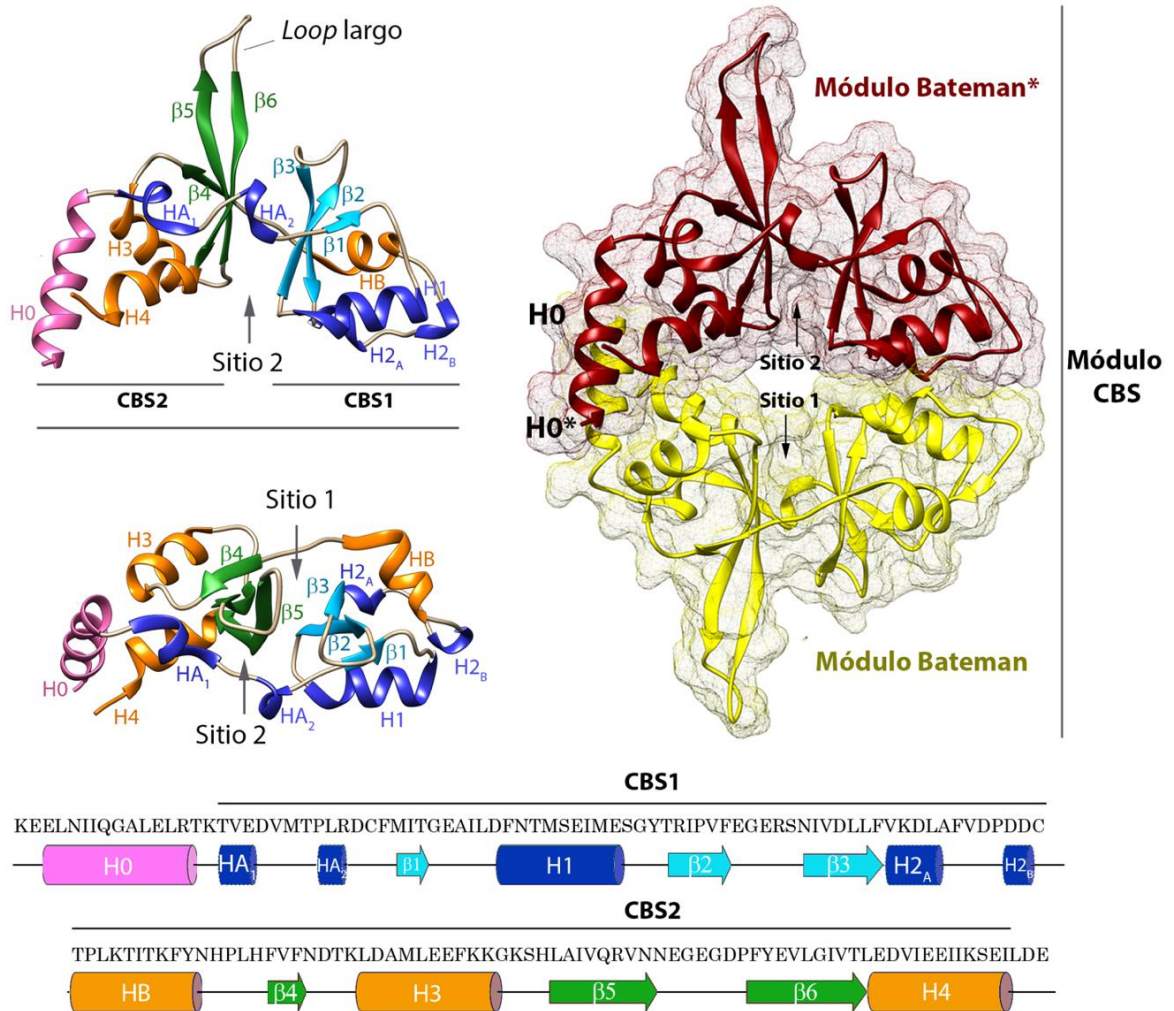


Figura 1.11. Estructura del Módulo Bateman de CNNM2. (Izquierda). Dos vistas de los elementos estructurales que conforman el módulo Bateman de CNNM2. Las cavidades principales simétricas S1 y S2 se encuentran indicadas. (Derecha) El módulo CBS de CNNM2 es un módulo paralelo donde los motivos CBS1 complementarios se encuentran enfrentados. Las cavidades complementarias S2 se localizan en lados opuestos del disco. (Abajo) Secuencia de aminoácidos del módulo Bateman de CNNM2. Los elementos de estructura secundaria se muestran encima de la secuencia.

La formación del módulo CBS en los CNNMs sugiere que la unidad funcional de la proteína es un dímero. En este dímero, los motivos CBS2 complementarios (y por tanto las hélices H0 que conectan con el dominio DUF21) se enfrentan uno respecto del otro, cerca del lado citoplasmático de la membrana celular, mientras que los motivos CBS1 se mantienen lejos de ella^{181,209}. Por su parte, las cavidades complementarias S2 de las dos subunidades se sitúan en lados opuestos del disco^{181,209}. Una consecuencia importante de la asociación paralela de los módulos Bateman es que este tipo de

Introducción

ensamblaje asegura una comunicación simétrica y coordinada de las subunidades complementarias con el dominio DUF21 y con el resto de dominios que conforman el transportador completo^{181,209}. Una característica única que diferencia el módulo Bateman de los CNNMs de aquellos presentes en otras proteínas, es la presencia de una región elongada (“*loop*” largo) entre las últimas dos láminas β del motivo CBS2²⁰⁹ (Fig .1.11).

La región C-terminal de los CNNMs incluye un dominio similar a un dominio de unión a nucleótidos cíclicos monofosfato (cNMP, por sus siglas en inglés “Cyclic nucleotide monophosphate” o CNBD por sus siglas en inglés “Cyclic nucleotide binding domain”) (Código PFAM PF00027) (Fig 1.10.), que comparte una identidad de aminoácidos de aproximadamente el 50% entre los cuatro CNNMs. A este dominio, le sigue una región larga potencialmente desestructurada denominada “Cola C” o “C-tail”, que constituye el extremo C-terminal de la proteína (Fig 1.10.). En los CNBDs clásicos de otras proteínas, esta región está bien plegada e incluye una larga hélice α , normalmente denominada αC ^{6,211}.

1.4.2. Ligandos y moléculas que interaccionan con los CNNMs.

La identificación de moléculas que interaccionan con los CNNMs ha sido poco explorada hasta el momento. Estas se pueden clasificar en dos grupos generales: (1) Moléculas que intervienen en la localización celular de los CNNMs y (2) moléculas que modulan su actividad de transporte¹⁸¹. Este último grupo puede subdividirse a su vez en dos categorías (i) Moléculas pequeñas (nucleótidos e iones metálicos) y (ii) Macromoléculas (proteínas)¹⁸¹.

1.4.2.1. Moléculas que intervienen en la localización celular.

Ante los resultados que mostraban la localización basolateral de los CNNMs en el epitelio renal e intestinal^{156,159} Hirata y colaboradores examinaron el papel potencial de las proteínas adaptadoras de clatrina (AP) en la localización de CNNM4²¹². Las APs están relacionadas con el reconocimiento del cargo a través de la unión directa a diferentes motivos señal en sus correspondientes dianas^{213,214}. La proteína AP-1 contiene cuatro subunidades: γ , $\beta 1$, $\sigma 1$, y $\mu 1$. De ellas, $\mu 1A$ y $\mu 1B$ se complementan en reconocer CNNM4 y dirigirlo a la membrana basolateral a través del reconocimiento de tres motivos de dileucina (L575/576, L758/759 y L765/766), los cuales se localizan en el dominio cNMP de CNNM4 y en la región C-terminal²¹². Este estudio atribuyó por primera vez, un papel concreto al dominio cNMP en la función de los CNNMs¹⁸¹.

1.4.2.2. Moléculas pequeñas que modulan la actividad de los CNNMs.

Los dominios cistationina β sintasa (CBS) que componen un módulo Bateman se caracterizan por su capacidad para unir derivados de adenosina. La unión de estas moléculas promueve cambios conformacionales en ellos que modulan la actividad de las proteínas. Este mecanismo de regulación ocurre por ejemplo en el transportador de Mg^{2+} bacteriano MgtE (Apartado 1.3.1.1) o en los canales de cloruro CICs, que unen ATP en la cavidad S2 del módulo Bateman^{62,65,67,73,215}. De la misma manera, los CNBDs presentes en canales iónicos y en kinasas dependientes de nucleótidos cíclicos sufren cambios estructurales inducidos por la interacción con segundos mensajeros como AMPc o GMPc²¹⁶⁻²¹⁸. Teniendo en cuenta estos antecedentes, la identificación de un módulo Bateman y un dominio cNMP en la región citoplasmática de los CNNMs, sugirió inmediatamente la posibilidad de que estuvieran regulados por moléculas pequeñas¹⁷¹. La primera evidencia experimental aparece en el estudio llevado a cabo por Hirata *et al*, que utilizaron la técnica de “*Surface Plasmon Resonance*” o SPR para detectar la unión de ATP al módulo Bateman de CNNM2 ($K_d \approx 160 \mu M$), la cual es dependiente de la presencia de Mg^{2+} ¹⁵⁵. La mutación encontrada en pacientes, T568I, que causante de hipomagnesemia familiar dominante¹⁵⁶ impide la interacción con el ATP, confirmando la idea de que la unión de nucleótidos regula la actividad del transportador¹⁵⁵. Prácticamente en paralelo, y utilizando RMN, Corral-Rodríguez *et al*, confirmaron la interacción dependiente de Mg^{2+} de CNNM2 con ATP²⁰⁹. Al contrario que en el estudio llevado a cabo por Hirata *et al*, también se evidenció interacción con AMP y ADP (Corral-Rodríguez *et al*, 2014). En este estudio, la afinidad encontrada por el ATP era muy débil, ($K_D > 10^{-2} M$), incluso en presencia de Mg^{2+} ²⁰⁹. Las señales del espectro afectadas por el ATP diferían de aquellas afectadas solo por Mg^{2+} , indicando que los cationes Mg^{2+} y los nucleótidos interaccionaban en diferentes sitios de la proteína²⁰⁹.

La resolución estructural del módulo Bateman de CNNM2, en ausencia y en presencia de Mg^{2+} y ATP unidos (MgATP) en la cavidad S2 evidenció la presencia de cambios conformacionales tras la unión de ligandos²⁰⁹. En ausencia de nucleótidos unidos, los dos motivos CBS se mantienen en una orientación relativa que viene determinada a través de una red de interacciones hidrofóbicas, de puentes de hidrógeno y puentes salinos entre los residuos que forman las paredes de las dos cavidades, S1 y S2²⁰⁹. Entre estas interacciones hay que resaltar el puente salino formado por la arginina en la posición 480 y el glutamato en la posición 570, así como la red de puentes de hidrógeno centrada en la treonina 568^{181,209}. Esta serie de interacciones hace que el módulo CBS se encuentre en una conformación que los autores denominaron

Introducción

“*Alabeada*” (“*Twisted*”)²⁰⁹ (Fig. 1.12). Al unirse al sitio S2, el MgATP rompe todas estas interacciones preexistentes en esta cavidad y establece interacciones nuevas con los residuos de los dos motivos CBS de paredes opuestas de la cavidad. Esta secuencia de eventos, no solo interrumpe las interacciones que mantenían la orientación original entre motivos CBS, sino que además provoca el cambio de varios elementos de estructura secundaria, entre los que se encuentra la hélice H0 que conecta el módulo Bateman con la región transmembrana^{181,209}. Hay que resaltar que la localización de la cavidad S2 en sitios opuestos del módulo CBS permite la unión de ATP a los dos módulos Bateman complementarios en el dímero, y hace el proceso estructuralmente simétrico. La consecuencia de esta serie de eventos es el aplanamiento del módulo CBS, el cual adopta una conformación de disco plano, o conformación “*Flat*”²⁰⁹ (Fig 1.12). En aparente contradicción, la mutación patogénica T568I, que impide la unión de ATP¹⁵⁶, mimetiza, en términos conformacionales, el efecto de la unión de MgATP al módulo Bateman^{155,209}. La conformación plana del módulo CBS en la proteína mutante es irreversible, ya que la ruptura de la red de puentes de hidrógeno que se centra en el residuo T568 es permanente ²⁰⁹.

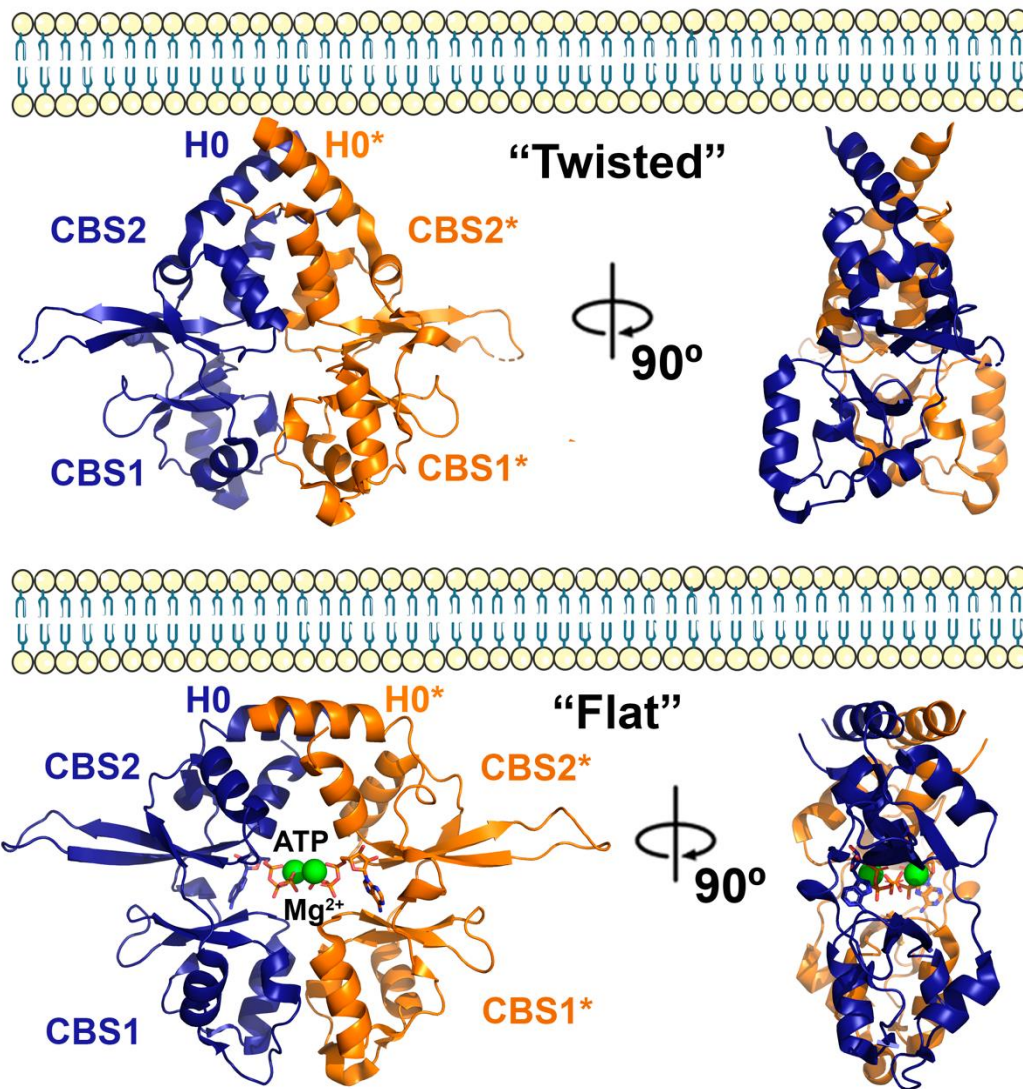


Figura 1.12. El módulo Bateman de CNNM2 sufre un cambio conformacional al unir MgATP. (Arriba) dos vistas de la estructura del módulo Bateman de CNNM2 en ausencia de ligandos unidos. La conformación adoptada es la que los autores denominaron "Twisted". Un módulo Bateman se representa en azul y el complementario en naranja. (Abajo) Dos vistas del módulo Bateman de CNNM2 al unir MgATP en el sitio S2. La proteína sufre un cambio conformacional y adopta lo que los autores denominaron conformación "Flat", donde los motivos CBS1 se encuentran en el mismo plano. El Mg^{2+} se representa como dos esferas verdes y las moléculas de ATP en azul y naranja respectivamente.

1.4.3. Macromoléculas que interactúan con los CNNMs: PRLs

En 2014, dos estudios llevados a cabo por los laboratorios de Michel Tremblay en la McGill University, de Montreal¹⁷⁸ y de Miki Hiroaki, en la universidad de Osaka¹⁶⁰, desvelaron un nuevo e inesperado mecanismo oncogénico que implicaba la participación de los CNNMs. De forma independiente, ambos grupos demostraron que la interacción entre miembros de la familia CNNM (CNNM3 y CNNM4) y las fosfatasas PRL, (Por sus siglas en inglés "*Phosphatases of Regenerating Liver*"), causaba un

Introducción

aumento de la concentración intracelular de magnesio en células tumorales^{158,160}. Las PRLs son una subfamilia de las proteínas tirosina fosfatasas (PTPs), que incluyen tres miembros (PRL-1,-2 y -3) y se encuentran relacionadas con la proliferación celular tumoral, migración, invasión y metástasis²¹⁹. Las PRLs han sido relacionadas con el proceso metastático en diferentes tipos de cáncer²²⁰, y se encuentran sobreexpresadas en la mayoría de tumores sólidos y hematológicos, especialmente en tumores metastáticos²²⁰. Por ello, son consideradas como las PTPs más oncogénicas²²⁰⁻²²². Las PRLs presentan un sitio de prenilación en la región C-terminal que guía a las proteínas a su localización en el compartimento endosomal de la membrana plasmática²²³. Los tres miembros de la familia presentan una alta similitud, con más de un 70% de homología en su secuencia de aminoácidos, sin embargo, sus patrones de expresión varían en diferentes tejidos. De las tres, PRL-2 es la más abundante y se expresa ubicuamente en prácticamente todas las células humanas^{223,224}. Las PRLs han sido relacionadas con diferentes rutas de señalización celular entre las que se incluyen la regulación por integrinas, c-Src, Akt-PI3K y las GTPasas de la familia Rho²²⁵⁻²³⁰. Sin embargo, su función biológica exacta sigue siendo desconocida. En 2014, con la aparición de los dos artículos mencionados anteriormente^{158,160}, se demostró que las PRLs interactúan directamente con los transportadores CNNM formando complejos, lo que aportó nuevas pistas sobre la función de estas proteínas^{158,160}.

Utilizando constructos de diferente longitud, Hardy *et al*, demostraron que CNNM3 humano forma un complejo estable con la fosfatasa PRL-2. Se postuló que la interacción entre estas dos proteínas tiene lugar a través del módulo Bateman de CNNM3, y más concretamente a través del “*loop*” largo que une las dos láminas β del motivo CBS2¹⁵⁸. Este hallazgo se corroboró demostrando que una forma truncada del módulo Bateman sin el “*loop*” largo era incapaz de formar el complejo con las PRLs. El “*loop*” largo que presentan los CNNMs es una característica anómala que no se observa en otras proteínas que contienen dominios CBS (Corral-Rodríguez, 2014). Mediante estudios filogenéticos, los mismos autores revelaron que este elemento estructural peculiar de los CNNMs solo está presente cuando el organismo presenta un ortólogo de las proteínas PRL. Este hecho les llevó a postular la co-evolución de ambas familias de proteínas, y que la formación del complejo es importante para sus respectivas funciones¹⁵⁸. Utilizando diferentes líneas celulares, Hardy *et al* también observaron que, en ausencia de Mg^{2+} , la fosfatasa PRL-2 se sobreexpresa, y aumentan los niveles de formación de complejo, los cuales también se correlacionan con un aumento de los niveles de Mg^{2+} intracelular¹⁵⁸. Además, la inhibición de la expresión de PRL-2 mediante shRNA conllevó una disminución en la entrada de Mg^{2+} en las células, lo que apoya que

Introducción

PRL-2 regula el transporte celular de este catión. Por otro lado, ratones KO de PRL-2 mostraban niveles significativamente más altos de Mg^{2+} en suero sanguíneo que los ratones control, mientras que no existían diferencias en otros electrolitos. Todos estos resultados apoyaron la teoría de que PRL-2 tiene un papel importante en el transporte de magnesio¹⁷⁸.

Resultados similares fueron obtenidos por Funato y colaboradores, quienes demostraron la interacción entre CNNM4 humano y los tres miembros de la familia PRL (Funato, 2014). En un estudio previo del mismo laboratorio, se mostró que CNNM4 es un extrusor de Mg^{2+} , que se intercambia con Na^+ ($Mg^{2+}/2Na^+$)¹⁵⁹. En este trabajo, los autores evaluaron el efecto de las PRLs sobre la extrusión de Mg^{2+} mediada por CNNM4. De forma análoga al trabajo de Hardy *et al*, los autores observaron que la sobreexpresión de las PRLs y por tanto la formación del complejo PRL·CNNM4 aumenta los niveles intracelulares de Mg^{2+} , aunque en este caso, este aumento fue atribuido a una inhibición de la extrusión de Mg^{2+} de CNNM4. La controversia sobre si la sobreexpresión de las fosfatasas PRLs favorece la intrusión de Mg^{2+} a través de las CNNMs o si, por el contrario, inhibe la extrusión de Mg^{2+} es un ejemplo más del debate existente sobre la función de la familia de transportadores de Mg^{2+} CNNM. En cualquier caso, ambos estudios concluyeron que la formación del complejo aumenta los niveles de Mg^{2+} intracelular, bien sea por una inhibición de la extrusión o por la activación de la intrusión de Mg^{2+} , y que este aumento del Mg^{2+} intracelular en células tumorales contribuye al crecimiento y agresividad tumoral^{160,178,231}.

2. Objetivos

Objetivos

1. Estructura de la región intracelular de la proteína CNNM4

- 1.1. Estructura del módulo Bateman de CNNM4
 - 1.1.1 Identificación de los sitios de unión de ATP
 - 1.1.2 Identificación de los sitios de unión de iones Mg^{2+}
 - 1.1.3 Oligomerización y conformación del módulo Bateman
 - 1.1.4 Similitudes y diferencias con otras proteínas

- 1.2. Estructura del dominio cNMP de CNNM4.
 - 1.2.1 Caracterización bioquímica y biofísica del dominio cNMP
 - 1.2.2 Identificación de potenciales sitios de unión a nucleótidos cíclicos
 - 1.2.3 Oligomerización y conformación del dominio cNMP
 - 1.2.4 Similitudes y diferencias con el dominio cNMP de otras proteínas
 - 1.2.5 Función del dominio cNMP

- 1.3. Estructura de la región intracelular de CNNM4
- 1.4. Mecanismos de transporte de Mg^{2+} mediados por CNNM4.

2. Bases estructurales de la interacción oncogénica entre CNNMs y PRLs

- 2.1. Estructura del complejo $CNNM2_{BAT} \cdot PRL-1$.
- 2.2. Caracterización bioquímica y biofísica del complejo $CNNM2_{BAT} \cdot PRLs$
- 2.3. Estructura del complejo $CNNM2_{BAT} \cdot PRL-1 \cdot ATP$
- 2.4. Estructura del complejo $CNNMs_{BAT-cNMP-Ctail} \cdot PRLs$.
- 2.5. Mecanismo de extrusión de Mg^{2+} mediado por CNNM4 y las PRLs

3. Materiales y métodos

3.1. PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

3.1.1. Sobreexpresión y purificación del constructo CNNM2_{BAT}

El constructo CNNM2_{BAT}, que comprende el módulo Bateman de CNNM2 de *Mus musculus* (residuos 429-584) se clonó en el vector pET101/D-TOPO (thermofisher), siguiendo el protocolo previamente descrito en ²⁰⁹. El vector con el constructo se transformó en células competentes de la cepa de *E. coli* BL21 *star* (DE3) (Thermofisher) mediante la técnica de choque térmico²³², mezclando 10ng de vector con 50µL de bacterias competentes. La mezcla se mantuvo en hielo durante 20min. A continuación las células se sometieron a un choque térmico a 42°C durante 42seg. Inmediatamente después se transfirieron las células a hielo durante 2min y a continuación se les añadieron 500µL de medio Luria-Bertani (LB) previamente atemperado a 37°C. Las células se dejaron en agitación a 37°C en un incubador Excella E24R (New Brunswick Scientific) durante 45min y posteriormente se centrifugaron a 18000g durante 1min en una centrífuga de mesa Microfuge 22R (Beckman Coulter) a 4°C. El sobrenadante fue descartado y las bacterias se sembraron en una placa de LB agar que contenía 100 µg mL⁻¹ de ampicilina. Las placas se incubaron en estufa toda la noche a 37°C. Al día siguiente, se picó una colonia crecida en la placa, y se dejó crecer toda la noche en 150mL de LB con 100 µg mL⁻¹ de ampicilina, a 37°C en agitación. Este cultivo sirvió como preinóculo para un cultivo posterior a gran escala.

La sobreexpresión a gran escala de CNNM2_{BAT} se realizó en matraces de 5L que contenían 2L de medio LB, previamente autoclavado. Una vez atemperado a 37°C, se añadieron ampicilina (a una concentración final de 100 µg mL⁻¹) y 20mL del preinóculo crecido previamente. El cultivo se dejó crecer a 37°C manteniendo agitación, hasta alcanzar una densidad óptica A600nm (OD₆₀₀) ≈ 0.8, medida en un espectrofotómetro WPA Biowave CO8000 cell Density Meter. La expresión de CNNM2_{BAT} se indujo mediante la adición de Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0.5 mM. El cultivo se dejó crecer durante 4h a 37°C, y a continuación se centrifugó a 5053g en una centrífuga Avanti J-26 XP (Beckman coulter) durante 20min. Se descartó el sobrenadante y el pellet se mantuvo a -20°C hasta el momento de su utilización.

Materiales y métodos

La purificación de la proteína se realizó de acuerdo a los siguientes pasos: Primero se resuspendió el pellet de bacterias en tampón de lisis (50mM de MES pH6, 1mM Ditioneitol (DTT), 1mM Benzamida, 0.1mM Fluoruro de fenilmetilsulfonio (PMSF) y DNAsas). Las bacterias se lisaron mediante sonicación en un sonicador Sonics Vibracell VCX500, durante 10 ciclos de 15s y un 60% de amplitud, manteniendo siempre el lisado refrigerado en hielo. Se dejó un tiempo de reposo de 59s entre cada ciclo de sonicación. Inmediatamente después, se ultracentrifugó el lisado a 186009g durante una 1h a 4°C utilizando una ultracentrífuga Optima L-90K (Beckman Coulter) y el rotor 45TI (Beckman Coulter). La purificación de la proteína se realizó en dos pasos cromatográficos. El primero consistió en un intercambio iónico, aprovechando la carga negativa que adquiere la proteína CNNM4_{BAT} a pHs superiores a su punto isoeléctrico (4.41). Se cargó el sobrenadante obtenido del lisado celular en una columna de intercambio aniónico HiTrap Q HP 5mL (GE healthcare) conectada a un sistema AKTA-FPLC a 4°C, previamente equilibrada en un tampón que contenía 50mM MES pH6 y 1mM DTT (Tabla 3.1). La elución de la proteína se realizó aplicando un gradiente de 20 volúmenes de columna (CV) del tampón de elución, que contenía 50mM MES pH 6, 1M NaCl y 1mM DTT. La presencia de CNNM2_{BAT} se confirmó mediante electroforesis en gel de acrilamida SDS-PAGE (apartado 3.2.1) y posterior análisis por espectrometría de masas en colaboración con la plataforma de Proteómica de CIC bioGUNE. Las fracciones con mayor grado de pureza, se concentraron mediante centrifugación a 3901 g en un Amicon Ultra-15 10K (Milipore) hasta un volumen final aproximado de 2 mL. La solución concentrada se inyectó en una columna de filtración en gel (o de exclusión por tamaño) Hi Load 16/60 Superdex-75 (Ge Healthcare) previamente equilibrada en tampón 20mM HEPES pH 7,4; 200mM NaCl; 1mM DTT. La elución de la proteína se realizó a un flujo de 0.3 mL min⁻¹. La presencia de CNNM2_{BAT} se confirmó mediante SDS-PAGE y espectrometría de masas. Se seleccionaron las fracciones de mayor pureza y se concentraron mediante centrifugación a 3901g a 4°C utilizando un concentrador Amicon Ultra-15 10K. La proteína se alícuotó y congeló mediante inmersión en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C hasta el momento de uso.

3.1.2. Sobreexpresión y purificación del constructo CNNM2_{cNMP}

El constructo CNNM2_{cNMP}, que incluye el dominio cNMP de *Mus musculus* (residuos 593-875), una cola de seis histidinas (6xHis) en el extremo N-terminal, y una secuencia ENLYFQG de reconocimiento de la proteasa TEV (Tobacco Etch Virus)²³³, fue clonado en el laboratorio de nuestro colaborador, el Dr. Dominik Müller (Le Charité, Berlín) en el vector pET11d (Novagen). Siguiendo el protocolo descrito en el apartado anterior 3.1.1, se transformaron células quimiocompetentes de *E. coli* BL21 (DE3) con el vector que contenía la proteína de interés. A continuación se preparó un preinóculo a partir de una colonia de bacterias crecida en placa LB-Agar. Esta colonia se creció a 37°C durante toda la noche en 150mL de medio LB con 100µg mL⁻¹ de ampicilina, manteniendo agitación. El preinóculo se utilizó posteriormente para sobreexpresar la proteína a gran escala. Para ello, se añadieron 20mL de preinóculo por cada 2L de medio LB previamente autoclavado y atemperado, con una concentración final de 100µg mL⁻¹ de ampicilina. El cultivo se dejó crecer a 37°C hasta una OD₆₀₀ aproximada de 0.8, momento en el cual se indujeron los cultivos añadiendo IPTG a una concentración final 0.5mM. Se dejaron crecer las bacterias durante la noche (O/N) a 20°C. Posteriormente, se centrifugaron los cultivos a 5053g durante 20min, se retiró el líquido sobrenadante y se almacenaron los pellets bacterianos a -20°C hasta el momento de uso.

La purificación de la proteína se realizó siguiendo los siguientes pasos: 1) Lisis bacteriana: se resuspendió el pellet aislado en el proceso anterior en tampón de lisis (50mM TRIS pH 8, 300mM NaCl, 1mM DTT; 1mM Benzamidina, 0.1mM PMSF, DNAsas) y se sometió a sonicación, manteniendo la muestra en hielo, siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado 3.1.1. Inmediatamente después, se ultracentrifugó el lisado a 18600g durante una 1h a 4°C utilizando una ultracentrífuga Optima L-90K y el rotor 45TI, (Beckman Coulter). 2) Primera cromatografía de afinidad: a continuación se sometió la muestra a una cromatografía de afinidad por níquel (Ni²⁺) inmovilizado (IMAC), aprovechando la presencia de una cola 6xHis en el constructo. Se aplicó el lisado a una columna His Trap HP 5mL (Ge Healthcare) conectada a un sistema AKTA-FPLC, y previamente equilibrada con 10CV de buffer 50mM TRIS pH 8, 300mM NaCl, 50mM Imidazol, 1mM DTT, a 4°C. A continuación se eluyó la proteína aplicando

Materiales y métodos

un gradiente de 20CV de tampón de elución, que contenía 50mM Tris pH8, 300mM NaCl, 300mM Imidazol y 1mM DTT. La presencia de CNNM2_{CNMP} se confirmó mediante SDS-PAGE y posterior análisis por espectrometría de masas (Apartado 3.2.1). La cola 6xHis localizada el extremo N-terminal de la proteína se eliminó aprovechando el epítipo de reconocimiento de la proteasa TEV insertado en el vector. Para ello se utilizó 1mg de proteasa TEV por cada 30mg de proteína diana, dializando frente a un tampón que contenía 50mM Tris pH 8, 150mM NaCl, 1 mM DTT, a 4°C durante toda la noche. 3) Segunda cromatografía de afinidad: El objetivo de este paso es eliminar la cola 6xHis proteolizada de la proteína diana, así como la proteasa TEV que también contiene una cola de histidinas. Se centrifugó la solución proteolizada el día anterior durante 10min a 3901g. El sobrenadante se aplicó nuevamente a una columna His Trap HP 5mL previamente equilibrada en 50mM TRIS pH 8, 300mM NaCl, 50mM Imidazol, 1mM DTT. El volumen de la solución que contiene la proteína y que no se había pegado a la columna, se redujo hasta aproximadamente 2 mL mediante centrifugación a 3901 g con un Amicon Ultra-15 10K (Milipore). 4). La solución obtenida en el paso cromatográfico anterior fue inyectada en una columna de exclusión molecular Hi Load 16/60 Superdex-75 (Ge Healthcare) previamente equilibrada en el mismo buffer. La elución de la proteína se realizó a un flujo de 0.3mL min⁻¹ en 1 CV. La presencia de CNNM4_{CNMP} se confirmó mediante SDS-PAGE y espectrometría de masas. Se seleccionaron las fracciones de mayor pureza y se concentraron en un Amicon Ultra-15 10K hasta una concentración aproximada de 10mg mL⁻¹. La proteína fue alícuotada en volúmenes de entre 25 y 50 µL, congelada mediante inmersión en nitrógeno líquido, y almacenada a -80°C hasta el momento de su utilización.

3.1.3. Sobreexpresión y purificación de la fosfatasa PRL-1.

La fosfatasa PRL-1 de *Mus musculus* fue clonada en el laboratorio de nuestro colaborador, el Profesor Michel L. Tremblay (McGill University, Montreal, Canadá) en el plásmido pDEST17. El plásmido pDEST17 pertenece a la familia de plásmidos del sistema Gateway® (ThermoFisher)²³⁴ y añade una cola 6xHis en el extremo N-terminal de la proteína diana. Este plásmido fue transformado en células BL21 (DE3) siguiendo el mismo protocolo descrito para CNNM2_{BAT} (Apartado 3.1.1). La sobreexpresión se realizó siguiendo un protocolo similar al de

Materiales y métodos

CNNM2_{CNMP} (Apartado 3.1.2), con la diferencia que los matraces se dejaron crecer en agitación a 37°C sin necesidad de inducir con IPTG, en un incubador Excella E24R (New Brunswick Scientific) durante toda la noche. Al día siguiente se centrifugaron los cultivos a 5053g durante 20min para recoger las bacterias. Los pellets se guardaron a -20°C hasta el momento de su uso.

El pellet congelado se resuspendió en un tampón de lisis que contenía 50mM Tris pH 8, 300mM NaCl, 1mM DTT, 50mM Imidazol, 1mM Benzamidina, 0.1mM PMSF y DNAsas. Las bacterias se lisaron mediante sonicación siguiendo el mismo protocolo que para CNNM2_{BAT} (Apartado 3.1.1). A continuación se ultracentrifugó el lisado a 186009g con el rotor 45TI durante 1h a 4°C. El sobrenadante se cargó en una columna de afinidad de Níquel HisTrap HP 5mL (GE healthcare), conectada a un sistema AKTA-FPLC a 4°C, previamente equilibrada con 20mM Tris pH 8, 300mM NaCl, 50mM Imidazol, 1mM DTT, aprovechando que el constructo utilizado de PRL-1 contiene una cola 6xHis en el extremo N-terminal. Una vez lavada la columna con 10CV se eluyó la proteína aplicando un gradiente de 20CV de tampón de elución (50mM Tris pH8, 300mM NaCl, 1M Imidazol y 1mM DTT).

La presencia de PRL-1 se confirmó mediante SDS-PAGE (apartado 3.2.1) y espectrometría de masas. Se seleccionaron las fracciones que contenían PRL-1, y se concentraron hasta un volumen de aproximadamente 2mL, utilizando un concentrador Amicon Ultra-15 10K centrifugando a 4°C y 3901g. La solución concentrada se inyectó en una columna de exclusión molecular HiLoad 16/60 Superdex-75 previamente equilibrada en tampón 20mM HEPES pH 7,4; 200mM NaCl; 1mM DTT. La elución de la proteína se realizó a un flujo de 0.3mL min⁻¹ y en 1 CV. La pureza de PRL-1 se confirmó mediante SDS-PAGE. Las fracciones seleccionadas se concentraron hasta aproximadamente 20 mg mL⁻¹. La proteína se alícuotó (entre 25 y 50 µL) y se congeló mediante inmersión en nitrógeno líquido. Se almacenó a -80°C hasta el momento de su utilización.

3.1.4. Purificación del complejo CNNM2_{BAT}-PRL-1

Para formar el complejo, se utilizó CNNM2_{BAT} y PRL-1 previamente purificadas siguiendo los protocolos descritos en los apartados 3.1.1 y 3.1.3. respectivamente.

Materiales y métodos

Ambas proteínas de pusieron en contacto siguiendo una relación estequiométrica calculada para que hubiera un exceso de 1.5 de PRL-1 frente a CNNM2_{BAT} con el objetivo de consumir todo el CNNM2_{BAT} presente en la solución.

Para encontrar las condiciones de formación del complejo se incubó la mezcla rangos de 20min, 1h, 2h, 4h y 12h a temperaturas de 4°C y 20°C. Al final las condiciones óptimas se fijaron en una incubación de la mezcla de ambas proteínas en hielo durante 2h antes de ser inyectada en una columna de exclusión molecular Superdex 200 10/300 gl (GE healthcare) previamente equilibrada con un tampón de elución que contenía 20mM Tris pH 8; 200mM NaCl; 1mM DTT. La elución de la proteína de la columna se realizó a un flujo de 0.5ml min⁻¹ en un volumen de columna con el objetivo de separar el complejo formado de la proteína PRL-1 sobrante. Debido al aumento de tamaño, el complejo formado eluye de la columna antes que las dos proteínas por separado. Por tanto, también se inyectaron en la misma columna y en las mismas condiciones las dos proteínas independientes a modo de control. Se confirmó la formación de complejo entre CNNM2_{BAT}-PRL-1 mediante SDS-PAGE (apartado 3.2.1) y espectrometría de masas. Las fracciones que contenían el complejo más puro se seleccionaron y fueron concentradas, alicuotadas y congeladas mediante inmersión en nitrógeno líquido para su posterior almacenamiento a -80°C hasta el momento de su utilización.

3.1.5. Sobreexpresión y purificación de CNNM4_{BAT}

El constructo de CNNM4 que comprende el módulo Bateman (residuos 356-511) fue clonado en el vector pET101/D-TOPO (thermofisher), siguiendo el protocolo descrito en²³⁵. El plásmido que contenía el constructo se transformó en la cepa *Rosetta* de células de *E.coli* competentes (Stratagene). La sobreexpresión fue iniciada siguiendo un protocolo similar al de CNNM2_{BAT} (Apartado 3.1.1). Sin embargo, una vez alcanzada una OD₆₀₀ de 0.6 los cultivos fueron equilibrados a 20°C durante media hora, para a continuación añadir IPTG a una concentración final de 0.5mM. Los cultivos se dejaron crecer durante la noche a 20°C en agitación. A continuación se centrifugaron a 5053g durante 20min y el pellet se mantuvo a -20°C hasta el momento de su utilización.

Materiales y métodos

El pellet se resuspendió en un tampón de lisis que contenía 25 mM HEPES pH 7.4, 400 mM NaCl, 20 mM imidazol, 1 μ M β -mercaptoetanol, 0.1 mM PMSF, 1 mM benzamidina y DNAsas. A continuación se lisó mediante sonicación y se centrifugó, siguiendo el protocolo descrito en el Apartado 3.1.1. Inmediatamente después de centrifugar, el lisado bacteriano se cargó en una columna de afinidad de 1mL HisTrap FF Crude (GE healthcare), previamente equilibrada en 25 mM HEPES pH 7.4, 400 mM NaCl, 20 mM imidazol. La proteína se eluyó en un tampón que contenía 25 mM HEPES pH 7.4, 400mM NaCl, 500 mM imidazol. Las fracciones que contenían la proteína (que fue confirmado mediante SDS-PAGE (Apartado 3.2.1) se concentraron hasta un volumen de aproximadamente 2mL, utilizando un concentrador Amicon Ultra-15 10K centrifugando a 4°C y 3901g. A continuación, la solución concentrada se cargó en una columna de filtración en gel HiLoad 16/60 Superdex-75 (Ge healthcare) previamente equilibrada en 150 mM HEPES pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM β -mercaptoetanol. La presencia de CNNM4_{BAT} en las fracciones obtenidas fue confirmada mediante SDS-PAGE (apartado 3.2.1), y las que contenían un mayor porcentaje de pureza se concentraron hasta aproximadamente 38mg mL⁻¹, se alicuotaron y se congelaron mediante inmersión en nitrógeno líquido. Las muestras fueron guardadas a -80°C hasta su momento de uso.

3.1.6. Sobreexpresión y purificación de CNNM4_{cNMP}

El constructo que contiene el dominio cNMP de CNNM4 (CNNM4_{cNMP}) (*Homo sapiens*) incluye los residuos 545-730 y descarta los últimos 45 residuos de la proteína que pertenecen a una región potencialmente desestructurada. El constructo fue clonado en el vector pHIS-Parallel2 que aporta una cola 6xHis en el extremo N-terminal seguido de una secuencia de reconocimiento de la proteasa TEV²³³ utilizando el mismo protocolo descrito en ²⁰⁹. El vector que contenía la proteína de interés se transformó en bacterias quimiocompetentes de la cepa de *E. coli* BL21 (DE3). La sobreexpresión se realizó siguiendo un protocolo similar al descrito en el apartado 3.1.1.

El protocolo de purificación de CNNM4_{cNMP} es similar al seguido con CNNM2_{cNMP}, descrito con más detalle en el apartado 3.1.2. Brevemente, tras la lisis del pellet bacteriano, el lisado se sometió a una cromatografía de afinidad por

Materiales y métodos

níquel, seguida de corte de la cola 6xHis con TEV, una segunda cromatografía de afinidad de níquel y una cromatografía de exclusión molecular en una columna HiLoad 16/60 superdex-75. La pureza de la proteína obtenida se comprobó mediante SDS-PAGE (apartado 3.2.1) y espectrometría de masas. Las fracciones seleccionadas se concentraron a 10mg mL^{-1} , se alicuotaron ($25\mu\text{L}$) y se congelaron mediante inmersión en nitrógeno líquido. La proteína se almacenó a -80°C hasta el momento de uso.

3.1.7. Producción de CNNM4_{cNMP} marcada con Selenio-Metionina

Para producir CNNM4_{cNMP} con selenio-metionina, el constructo (el mismo que se describe en el apartado 3.1.6 y que comprende los residuos 545-730) se transformó en células quimiocompetentes B834 (DE3) (Merck Milipore), las cuales son auxótrofas de metionina siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado 3.1.1.

El día antes a la sobreexpresión a gran escala se picó una colonia de la placa de agar y se pudo a crecer en 150mL de medio LB con $100\mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina, cultivo que fue utilizado como preinóculo. Para la sobreexpresión a gran escala, se inocularon 20mL del preinóculo en cada 2L de medio LB previamente autoclavado con ampicilina a una concentración de $100\mu\text{g mL}^{-1}$. Los cultivos se dejaron crecer a 37°C hasta llegar a la OD₆₀₀ de inducción (aproximadamente 0.7). A continuación se centrifugaron los cultivos a 5053g durante 20min y el sobrenadante (medio LB) fue desechado. Los pellets bacterianos se resuspendieron cuidadosamente en 1L de tampón fosfato salino (PBS) con el objetivo de eliminar los restos de medio LB que pudieran permanecer. El PBS con las bacterias se volvió a centrifugar a 5053g durante 20 min. Se descartó el sobrenadante y las bacterias fueron resuspendidas en medio SelenoMet™ que había sido preparado siguiendo el protocolo proporcionado por la casa comercial Molecular Dimensions. Por cada 2L de SelenoMet™ Medium Base previamente autoclavado, se añadieron 100mL de SelenoMet™ Nutrient Mix y 8mL de Selenio-metionina a 10mg mL^{-1} . Además se añadió IPTG a una concentración final de 0.5mM. Los cultivos se dejaron crecer 4h a 37°C . A continuación se centrifugaron durante 20min a 5053g y 4°C , se desechó el sobrenadante y el pellet bacteriano se guardó a -20°C hasta el momento de utilización.

3.1.8. Sobreexpresión y purificación de la región intracelular de CNNM4 (CNNM4^{BAT}-cNMP-Ctail)

El constructo que comprende la región intracelular de CNNM4 de *Homo sapiens* incluye los residuos 356-775 y presenta en la región N-terminal una cola 6xHis, una región de reconocimiento de la proteasa TEV, la hélice que conecta el módulo Bateman con la región transmembrana (H0, residuos 356-372), seguida del propio módulo Bateman y el dominio cNMP hasta el residuo C-terminal. Este constructo se clonó en el vector de expresión pHis-Parallel 2 siguiendo el protocolo descrito en ²³⁵. La sobreexpresión de la proteína se realizó siguiendo un protocolo similar al de CNNM2^{cNMP} (Apartado 3.1.2.). Una vez alcanzada una OD₆₀₀ aproximada de 0.8 a 37°C, se indujo la expresión con 0.5mM de IPTG y las bacterias se dejaron crecer O/N a 20°C. Al día siguiente se recogió el pellet bacteriano centrifugando a 5053g durante 20 min y se almacenó a -20°C hasta su utilización.

El constructo CNNM4^{BAT}-cNMP-Ctail se purificó siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado 3.1.2, lisando el pellet bacteriano mediante sonicación y purificando la proteína mediante una cromatografía de afinidad por níquel, corte de la cola 6xHis con proteasa TEV, seguido de otra cromatografía de afinidad por níquel, y una cromatografía de exclusión molecular, utilizando una columna Hi Load 16/60 Superdex-200 (GE Healthcare). La presencia y pureza de CNNM4^{BAT}-cNMP-Ctail se confirmó mediante SDS-PAGE (apartado 3.2.1) y espectrometría de masas. La proteína se concentró hasta 10mg mL⁻¹ utilizando un Amicon Ultra-15 10K centrifugando a 4°C y 3901g y a continuación fue alicuotada y congelada mediante inmersión en nitrógeno líquido. Se guardó a -80°C hasta el momento de uso.

3.1.9. Producción de mutantes CNNM4^{cNMP} y CNNM4^{BAT}-cNMP-Ctail F631A

Durante el desarrollo de este trabajo, fue necesario producir los mutantes F631A en los constructos CNNM4^{cNMP} y CNNM4^{BAT}-cNMP-Ctail. Para ello se encargaron a la casa comercial GeneScript, que ofrece servicio de clonaje. Estos constructos se clonaron en el vector de expresión pET11d, el cual presenta un promotor T7 y resistencia a ampicilina. Manualmente se añadió una cola de seis histidinas (6xHis) en el extremo N-terminal, seguido de la secuencia de

reconocimiento de TEV. La sobreexpresión y purificación de estos mutantes fue realizada siguiendo el mismo protocolo utilizado en CNNM4_{cNMP} y CNNM4_{BAT-cNMP-Ctail} respectivamente (Apartados 3.1.6 y 3.1.8).

3.1.10. Producción del complejo CNNM4_{BAT-cNMP-Ctail}-PRL-1

Para la producción del complejo formado por la región intracelular de CNNM4 (CNNM4_{BAT-cNMP-Ctail}) con PRL-1, se sobreexpresaron ambas proteínas por separado siguiendo los protocolos descritos en los apartados 3.1.3 y 3.1.8. Para producir el complejo, se juntaron los pellets bacterianos correspondientes, se resuspendieron en un tampón de lisis y se lisaron conjuntamente siguiendo un protocolo similar al descrito en el apartado 3.1.1. El protocolo de purificación empleado es similar al empleado para la región intracelular, e incluye una cromatografía de afinidad de níquel, eliminación de la cola 6xHis con la proteasa TEV y una segunda cromatografía de afinidad de níquel. En este caso, el objetivo de la segunda cromatografía es eliminar el exceso no acoplejado de CNNM4_{BAT-cNMP-Ctail}, que pierde la cola 6xHis tras la diálisis en presencia de TEV, ya que el complejo CNNM4_{BAT-cNMP-Ctail}-PRL-1 se sigue uniendo a la columna por la cola de 6xHis que tiene PRL-1 (PRL-1 no tiene secuencia de reconocimiento de TEV). También quedan retenidos en la columna el exceso no acoplejado de PRL-1 y la proteasa TEV que también presenta una cola 6xHis. La elución del complejo diana de la columna se realizó aplicando un 100% de tampón de elución (50mM TRIS pH 8, 300mM NaCl, 300mM Imidazol, 1mM DTT). Para eliminar la proteasa TEV, y el exceso de PRL-1, se llevó a cabo una cromatografía de intercambio iónico, aprovechando las diferencias en punto isoeléctrico de los diferentes componentes de la disolución (Complejo CNNM4_{BAT-cNMP-Ctail}-PRL-1: 5.7; PRL-1: 9.2; y TEV: 9) (Tabla. 3.1). Realizando una cromatografía en una columna de intercambio aniónico Hi Trap Q (Ge Healthcare) a pH 7.4, el TEV y el exceso de PRL-1 son eliminados, mientras que el complejo queda retenido en la columna. Para ello se aplicó la solución que contenía las tres proteínas en la columna previamente equilibrada con un tampón 50mM HEPES pH 7.4, 1mM DTT. Previamente fue necesario diluir la mezcla hasta una concentración final de NaCl de 60mM, favoreciendo así la unión del complejo a la columna. El complejo se eluyó mediante un gradiente de 30CV del tampón de elución, que contenía 50mM HEPES pH 7.4, 1M NaCl, 1mM DTT. La presencia de complejo se confirmó

mediante SDS PAGE (Apartado 3.2.1) y espectrometría de masas. Se seleccionaron las fracciones de complejo con mayor porcentaje de pureza y se redujo el volumen de la solución hasta aproximadamente 2mL, utilizando un concentrador Amicon Ultra-15 10K antes de inyectarse en una columna de exclusión molecular Hi Load 16/60 superdex-200 (GE Healthcare), previamente equilibrada en tampón 20mM HEPES pH 7.4, 200mM NaCl, 1mM DTT. El complejo se eluyó en 1CV a un flujo de 0.3mL min⁻¹. Su presencia y pureza se confirmaron de nuevo mediante SDS-PAGE y espectrometría de masas. Las fracciones que presentaban mayor pureza se seleccionaron, concentraron y alicuotaron. Posteriormente se congelaron mediante inmersión en nitrógeno líquido y almacenaron a -80°C hasta su utilización.

3.2. TÉCNICAS COMPLEMENTARIAS EN LA PURIFICACIÓN DE PROTEÍNA.

3.2.1. Electroforesis en gel de acrilamida

La presencia de la proteína de interés en los distintos pasos de purificación se confirmó mediante electroforesis en gel de acrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS) (SDS-PAGE). Se utilizaron geles que variaban en el contenido de poliacrilamida desde un 10 a un 15% (w/v) en función de la proteína que se quisiera visualizar. Las muestras se mezclaron con tampón de carga (o Tampón Laemmli) 2X que contenía 126mM Tris-HCl pH 6.8, 20% glicerol, 4% SDS, 0.02% azul de bromofenol (Bio-Rad). Las muestras se sometieron a un choque térmico a 95°C durante 5 min y se centrifugaron a 18000g a temperatura ambiente antes de ser cargadas en el gel. Como marcador de pesos moleculares se utilizó el kit Precision Plus Protein™ Dual Color standards (Bio-Rad). La electroforesis se llevó a cabo a 200V utilizando un tampón 25mM Tris, 190mM glicina, 0.1% SDS. Una vez finalizada la electroforesis, se tiñeron los geles utilizando ProBlue Safe Stain™ (Biotto Biotech) y se lavaron posteriormente con agua. Las imágenes de los geles fueron adquiridas con un equipo Image Quant (Ge Healthcare).

3.2.2. Determinación de la concentración de proteína.

La concentración de las proteínas diana purificadas se calculó utilizando un Nanodrop, a partir de la absorbancia a 280nm, y teniendo en cuenta el coeficiente de extinción molar teórico en cada caso (calculado con la herramienta disponible

Materiales y métodos

online ExPASy (apartado 3.2.3). El coeficiente de extinción molar (ϵ_{Prot}) en una solución acuosa se calcula a partir del contenido de aminoácidos de la proteína (concretamente del número de tirosinas (n_{Tyr}), número de triptófanos (n_{Trp}), y del número de cisteínas (n_{Cst}) que contiene), como se refleja en la ecuación 1.

$$\epsilon_{Prot} = (n_{Tyr} \cdot \epsilon_{Tyr}) + (n_{Trp} \cdot \epsilon_{Trp}) + (n_{Cst} \cdot \epsilon_{Cst})$$

Donde $\epsilon_{Tyr}=1490$, $\epsilon_{Trp}=5500$, $\epsilon_{Cst}= 125$ a 280nm.

La absorbancia de la proteína a 280nm se midió en un sistema Nanodrop, y su concentración (C) fue calculada mediante la ley de Lambert-Beer, reflejada en la ecuación 2.

$$Abs_{Prot} = \epsilon_{Prot} \cdot C \cdot l \quad \text{Donde } l \text{ es la longitud de onda.}$$

3.2.3. Determinación de parámetros estándar de proteínas

El peso molecular teórico, número de residuos, punto isoeléctrico y coeficiente de extinción molar (ϵ_{280}) de las proteínas utilizadas en este estudio (resumidos en la tabla 3.1) fueron calculados utilizando la herramienta disponible online ExPASy Bioinformatics Resource Portal (<https://web.expasy.org/protparam>).

Tabla. 3.1. Parámetros teóricos de las proteínas utilizadas en este estudio.

Proteína	Dominios	Límites (NºResiduos)	Mw (KDa)	Punto Isoeléctrico	ϵ_{280}
CNNM2 _{BAT}	H0+Bateman	429-584 (156)	17.8	4.41	4470
CNNM2 _{cNMP}	cNMP	593-875 (283)	31.7	8.29	13410
CNNM4 _{BAT}	H0+Bateman	359-511 (156)	18.0	4.35	5960
CNNM4 _{cNMP}	cNMP	545-730 (186)	20.9	9.01	17880
CNNM4 _{BAT-cNMP-Ctail}	H0+Bateman+cNMP +Ctail	356-775 (420)	47.8	5.08	25330
CNNM2 _{BAT-PRL-1}	Bateman+ PRL-1	(329)	37.6	5.35	24910
CNNM4 _{BAT-cNMP-Ctail-PRL-1}	H0+Bateman+cNMP +Ctail+ PRL-1	(593)	67.6	5.7	45270

3.3. CRISTALIZACIÓN DE PROTEÍNAS

3.3.1. Cristalización del complejo CNNM2_{BAT}·PRL-1.

La concentración apropiada de proteína para iniciar los experimentos de cristalización se determinó mediante un test comercial de Precristalización (PCT™, Hampton Research). En el caso del complejo CNNM2_{BAT}·PRL-1, la concentración que se estimó como adecuada para iniciar los primeros sets de *screens* se estableció en 15 mg mL⁻¹. El estudio preliminar de cristalización se inició mediante un cribado a gran escala automatizado, asistido por robots de manejo de líquidos y nanodispensadores automáticos, que permitieron examinar unas 2500 disoluciones distintas, procedentes de *screens* comerciales disponibles en la plataforma de Rayos-X del CIC bioGUNE (tabla 3.2.). La técnica utilizada en estos *screens* fue la de difusión de vapor en gota sentada (*sitting drop*) en placas de cristalización de 96 pocillos MRC. La distribución de disoluciones en los pocillos correspondientes se realizó con la ayuda de un robot TECAN freedom EVO (Tecan group Ltd.). Las gotas de cristalización se prepararon con la ayuda de un nanodispensador MOSQUITO (ttplabtech), mezclando 200nL de la disolución que contenía el agente precipitante con otros 200nL de la disolución que contenía el complejo CNNM2_{BAT}·PRL-1 purificado. El reservorio con la disolución precipitante contenía 50µl. Las placas se mantuvieron a 18°C durante el tiempo de formación de los cristales. La presencia o no de cristales fue comprobada con una lupa MZ12.5 (Leica).

Una vez identificadas condiciones preliminares prometedoras, que rindieron pequeños microcristales o en su defecto precipitados con aspecto cristalino, se procedió a realizar un cribado más específico dirigido a optimizar las condiciones de cristalización. En este segundo paso, se aumentó significativamente el tamaño de las gotas, y se trabajó empleando la técnica de gota colgante (*hanging drop*) en cajas limbro de 24 pocillos VDX. Las mejores condiciones preliminares para el complejo CNNM2_{BAT}·PRL-1 se encontraron del *screen* comercial SALT-RX (Hampton Research). Las gotas colgantes contenían 1µL de complejo y 1 µL de precipitante. La condición que finalmente proporcionó los cristales de mejor calidad contenía 0.1M Acetato de sodio, pH 4,6 y 2M formiato de amonio y una concentración de proteína de 15mg mL⁻¹. EL volumen de disolución precipitante en el reservorio durante el proceso de optimización fue de 0.5mL. Las placas

Materiales y métodos

fueron incubadas a una temperatura constante de 18°C en la plataforma de cristalización del centro. Los cristales crecieron en un tiempo aproximado de 24h.

Siguiendo un protocolo similar, se cristalizó el complejo CNNM2_{BAT}·PRL-1 en presencia de ATP y ZnCl₂. El ATP (SIGMA, A2383-1G) se añadió independientemente a la proteína a una concentración final de 3.7mM, resultando en una relación estequiométrica de 10:1 de nucleótido respecto de la proteína. El ZnCl₂ fue añadido como una fuente de cationes Zn²⁺, y se utilizó a una concentración final en la mezcla de 5mM. Los cristales en presencia de ATP-Zn crecieron en condiciones muy similares a las del complejo en ausencia de ligandos (0.1M Acetato de sodio, pH 4,6 y 2M formiato de amonio) El tiempo aproximado de crecimiento cristalino fue de 24h. A continuación se examinaron las mejores condiciones de congelación, sumergiendo los cristales en soluciones que contenían diferentes crioprotectores (alcoholes, sucrosa, agarosa y aceite de silicona entre otros). Los monocristales del complejo obtenidos en ausencia o en presencia de ZnATP con mejor apariencia morfológica, fueron sumergidos, primero, en una solución que contenía 0.1M Acetato de sodio, pH 4,6; 2M formiato de amonio y 25% de glicerol (v/v), y posteriormente en nitrógeno líquido. A continuación se almacenaron hasta la recolección de datos de difracción de rayos X en diferentes instalaciones sincrotrón europeas (ESRF (Francia), DIAMOND (UK) y ALBA (España)).

Tabla. 3.2. Screens de cristalización utilizados en este trabajo

Screen de Cristalización	Casa Comercial	Referencia
PCT™ Pre-Crystallization test	Hampton Research Corp	HR2-140
PEG/lon	Hampton Research Corp	HR2-126
PEG/lon 2	Hampton Research Corp	HR2-098
PEGRx1	Hampton Research Corp	HR2-082
PEGRx2	Hampton Research Corp	HR2-144
Index	Hampton Research Corp	HR2-107
SaltRx 1	Hampton Research Corp	HR2-107
SaltRx2	Hampton Research Corp	HR2-109
Crystal Screen Cryo™	Hampton Research Corp	HR2-122
Natrix	Hampton Research Corp	HR2-116
PACT premier	Molecular Dimensions Ltd	MD1-36
Morpheus™	Molecular Dimensions Ltd	MD1-46
JCSG-plus™	Molecular Dimensions Ltd	MD1-37
JCSG Core I Suite	QIAGEN	130724
JCSG Core II Suite	QIAGEN	130725
JCSG Core III Suite	QIAGEN	130726
JCSG Core VI Suite	QIAGEN	130727

3.3.2. Cristalización de CNNM4_{BAT}

La cristalización del módulo Bateman de CNNM4 fue realizada siguiendo el protocolo descrito en ²³⁵. La proteína se cristalizó en un rango de 20 a 60mg mL⁻¹ en 0.1M HEPES pH 7.5, 3.5-4 M NaCl, en un ratio 1:1 con 1µL de proteína sobre 1µL de precipitante. El método utilizado fue el de gota colgante en placas limbro de 24 pocillos VDX a 18°C en la plataforma de Rayos-X del centro. Los cristales de CNNM4_{BAT} se congelaron utilizando 20% sucrosa como crioprotector y se midieron en las líneas ID14.1 e ID23.2 en el sincrotrón ESRF (Grenoble, Francia). El mejor conjunto de datos se recogió a una resolución de 3.6Å.

3.3.3. Cristalización de CNNM4_{cNMP}

La concentración idónea para iniciar los experimentos de cristalización de CNNM4_{cNMP}, se determinó mediante un ensayo de pre-cristalización (PCT™, Hampton Research). La concentración apropiada se situó en torno a los 10mg mL⁻¹. Siguiendo un protocolo similar al del complejo CNNM2_{BAT}·PRL-1, la búsqueda de condiciones iniciales de cristalización se inició mediante un cribado a gran escala (Apartado 3.3.1.). Las condiciones más prometedoras se obtuvieron en los screens PEG ION 1 y 2 (Tabla 3.2.). El siguiente paso de optimización se realizó

variando diferentes parámetros como la concentración de proteína, la concentración y el tipo de precipitante, la temperatura, el volumen de la gota, la adición de detergentes y/o aditivos (sales, iones metálicos...) o utilizando técnica de microsemillaje (o *microseeding*)²³⁶ con cristales obtenidos de la misma proteína en una placa de gota colgante de 24 pocillos VDX. Las gotas colgantes contenían 1 μ L de complejo y 1 μ L de solución precipitante. Tras un laborioso proceso de optimización, los cristales de mejor calidad crecieron en 0.5M de Formiato de sodio, 5% de PEG 3350, 0.1M de Tris pH 7.2, a una concentración de proteína de 8mg mL⁻¹ en la placa de gota sentada, a una temperatura constante de 18°C, en un tiempo aproximado de 72h. Los cristales se recogieron en lazos de nylon y se congelaron en nitrógeno líquido tras sumergirlos previamente en una solución que contenía 0.5M de Formiato de sodio, 5% de PEG 3350, 0.1M de Tris pH 7.2 y 20% (v/v) de glicerol como agente crioprotector. Se eligió glicerol al 20% como agente crioprotector tras probar una serie de crioprotectores diferentes, como se indica en el apartado anterior. Los cristales se mantuvieron en nitrógeno líquido hasta colecta de datos.

3.4. RESOLUCIÓN ESTRUCTURAL POR TÉCNICAS CRISTALOGRÁFICAS DE RAYOS X.

3.4.1. Resolución estructural del complejo CNNM2_{BAT}-PRL-1.

Las líneas de sincrotrón utilizadas en este estudio fueron la línea MX-XALOC-BL13 del sincrotrón ALBA (Barcelona, España) y la línea ID 23-1 del sincrotrón ESRF (Grenoble, Francia) (Tabla 3.3)

Las imágenes de difracción se tomaron en intervalos angulares de 0.1 a 0.25° en función del cristal, situando el detector a una distancia que permitiera recoger datos de difracción hasta una resolución de 2 Å. El número de imágenes así como el ángulo de inicio, necesarios para conseguir el 100% de completitud del espectro fueron determinados mediante el programa EDNA²³⁷. Los parámetros de colecta utilizados con los cristales que proporcionaron las estructuras cristalinas en este trabajo, se encuentran reflejados en la tabla 3.3. Los datos de difracción obtenidos fueron indexados, integrados y escalados, con los programas XDS²³⁸ y autoPROC²³⁹.

Tabla. 3.3. Parámetros de colecta de las estructuras cristalográficas de este estudio

Parámetro de colecta	CNNM4 _{BAT}	CNNM4 _{CNMP}	Complejo CNNM2 _{BAT} .PRL-1	Complejo CNNM2 _{BAT} .PRL-1 Zn-ATP
Nº imágenes	360	3600	1440	1800
$\Delta\phi$ (%imagen)	1	0.1	0.25	0.2
Línea	ID14-1	I03	XALOC	ID 23-1
λ (Å)	0,9334	0.9794	0.9794	1.284
Tiempo exposición (seg)	0.25	0.08	0.25	0.037
Detector	CCD-ADSC QUANTUM 210	Pilatus 6M-Dectris	Pilatus 6M-Dectris	Pilatus 6M-Dectris
Temperatura (°C)	-173	-173	-173	-173

El complejo CNNM2_{BAT}.PRL-1 se resolvió mediante reemplazamiento molecular, empleando como modelos iniciales de búsqueda de fases las estructuras cristalinas independientes de CNNM2_{BAT} y de PRL-1 (Códigos PDB 4IY0 y 1XM2 respectivamente), resueltas anteriormente por nuestro laboratorio. Las fases fueron calculadas con el programa PHASER²⁴⁰ integrado en el paquete Phenix. La estructura del complejo CNNM2_{BAT}.PRL-1 unida a ATP-Zn, se resolvió mediante reemplazamiento molecular utilizando como modelo inicial la estructura del propio complejo. Posteriormente se calculó el mapa anómalo del Zn²⁺ con el programa Fast Fourier Transform (FFT)²⁴¹ integrado en CCP4²⁴². En ambos casos el modelo estructural se construyó manualmente con el programa COOT²⁴³ y fue sometido a varios ciclos de refinamiento con el programa Phenix Refine²⁴⁴. La calidad geométrica de las estructuras finales fue validada con Molprobit²⁴⁵. Las coordenadas atómicas de cada uno de los modelos se depositaron en el Protein Data Bank bajo los códigos de acceso 5MMZ y 5LXQ para el complejo CNNM2_{BAT}.PRL-1 y CNNM2_{BAT}.PRL-1 con ATP-Zn, respectivamente.

Las figuras que muestran estructuras en tres dimensiones se prepararon con el programa PyMOL (<http://www.pymol.org/>) y Chimera²⁴⁶. Los parámetros cristalográficos y las estadísticas del refinamiento se muestran en la Tabla 4.5 (Resultados).

3.4.2. Resolución estructural de CNNM4_{BAT}

Las líneas de sincrotrón utilizadas en las recogidas de datos de CNNM4_{BAT} fueron la ID23-2 y la ID14-1 del sincrotrón ESRF (Grenoble, Francia). La estrategia de colecta de datos necesaria para conseguir la máxima completitud de los datos se diseñó con el programa EDNA²³⁷ y se encuentra reflejada en la tabla 3.3. Los datos de difracción obtenidos se indexaron, integraron y escalaron mediante los programas XDS²³⁸ y autoPROC²³⁹.

La estructura de CNNM4_{BAT} se resolvió mediante reemplazamiento molecular, empleando como modelo inicial de búsqueda de fases la estructura cristalina de CNNM2_{BAT} (Código PDB 4IY0), resuelta anteriormente en nuestro laboratorio²⁰⁹. Las fases fueron calculadas con el programa PHASER²⁴⁰ integrado en el paquete Phenix. El modelo estructural se construyó manualmente con el programa COOT²⁴³ y fue sometido a varios ciclos de refinamiento con el programa Phenix Refine²⁴⁴. La calidad geométrica de la estructura final fue validada con Molprobit²⁴⁵. Las coordenadas atómicas del modelo se depositaron en el Protein Data Bank bajo el código de acceso 6RS2. Las figuras de modelos tridimensionales se prepararon con PyMOL (<http://www.pymol.org/>) y Chimera²⁴⁶. Los parámetros cristalográficos y estadísticas del refinamiento se muestran en la Tabla 4.2 (resultados).

3.4.3. Resolución estructural de CNNM4_{cNMP}

Las líneas de sincrotrón utilizadas para recoger los datos del constructo CNNM4_{cNMP}, fueron la línea MX-XALOC-BL13 en el sincrotrón ALBA (Barcelona, España), y las líneas I0-3, I0-4 e I-24 en el sincrotrón Diamond Light Source (Didcot, UK). (Tabla 3.3). La estrategia de colecta de datos necesaria para conseguir el 100% de completitud se diseñó con el programa EDNA²³⁷ y se encuentra reflejada en la tabla 3.3. Los datos de difracción obtenidos se indexaron, integraron y escalaron mediante los programas XDS²³⁸ y autoPROC²³⁹. Debido a la falta de un modelo que presentara homología estructural suficiente para resolver la estructura mediante reemplazamiento molecular, se decidió producir la proteína marcada con selenio-metionina y utilizar la señal anómala del selenio para calcular las fases cristalográficas, empleando la técnica de difracción anómala simple (SAD). Las posiciones de los átomos de selenio, determinadas con el programa

SHELX²⁴⁷ y con el programa AUTOSOL²⁴⁴, permitieron obtener las fases iniciales para resolver la estructura. El modelo inicial se construyó con la ayuda del programa BUCANEER²⁴⁸ y manualmente con el programa COOT²⁴³ y fue sometido a varios ciclos de refinamiento con el programa Phenix Refine²⁴⁴. La calidad geométrica de los modelos finales fue validada con Molprobity²⁴⁵. Las coordenadas atómica del modelo final se depositó en el Protein Data Bank bajo el código de acceso 6G52. Las figuras de modelos tridimensionales se prepararon con PyMOL (<http://www.pymol.org/>) y Chimera²⁴⁶. Los parámetros cristalográficos y estadísticas del refinamiento se muestran en la Tabla 4.2 (resultados).

3.5. DISPERSIÓN DE RAYOS X A BAJO ÁNGULO (SAXS)

Complementariamente a la cristalografía de rayos X, se empleó la técnica de dispersión de Rayos X a bajo ángulo (SAXS) para elucidar la estructura tridimensional en solución de los constructos CNNM4_{cNMP}, CNNM4_{BAT-cNMP-Ctail} y el complejo CNNM4_{BAT-cNMP-Ctail} unido a PRL-1 (Las estructuras de CNNM4_{BAT-cNMP-Ctail} y complejo CNNM4_{BAT-cNMP-Ctail} se analizaron tanto en presencia como en ausencia de MgATP). SAXS es una técnica de baja resolución que permite elucidar el tamaño y la forma de una proteína en solución²⁴⁹. Los datos de SAXS se recogieron en la línea bioSAXS B21 del sincrotrón “Diamond Light Source” (Didcot, UK). El estudio se realizó en colaboración con el Prof. Dritan Siliqi de la Universidad de Bari (Italia). Por cada medida se inyectaron 45µl de muestra en una columna de exclusión molecular KW-403 (Shodex) previamente equilibrada con un tampón que contenía 20mM HEPES pH 7.4, 200mM NaCl, 1mM DTT y conectada a un sistema HPLC (Agilent) a 20°C. En el caso de las muestras analizadas en presencia de MgATP, se añadió al tampón adenosina 5'-(β, γ-imido) trifosfato (ADPnP) (Sigma-Aldrich, A2647-5MG) (una forma de ATP no hidrolizable) y MgCl₂ a una concentración final de 5mM. Las muestras se incubaron con ADPnP y MgCl₂ durante 20min antes de ser inyectadas en la columna. El eluido de la columna se trasvasó directamente del HPLC a un capilar de cuarzo de 1.6mm de diámetro donde fue irradiado con Rayos X. La medida se realizó a un flujo de 0.16 mL min⁻¹. Se recogieron 620 imágenes con una exposición por imagen de 3s, en un detector PILATUS 2M (Dectris, Suiza) a una distancia 4.014m de la muestra. El ruido de las imágenes se eliminó manualmente con el programa ScÅtter (<http://www.bioisis.net/>). Se utilizó la aproximación de Guinier para calcular

Materiales y métodos

el radio de giro (R_g)²⁵⁰. El tamaño máximo de la proteína (D_{max}), se calculó a partir de la función de distribución de pares (Función $P(r)$). Todos los análisis expuestos anteriormente se realizaron con el programa ScÅtter (<http://www.bioisis.net/>) y el paquete ATSAS²⁵¹. Los modelos *ab initio* se generaron utilizando los programas englobados en el paquete ATSAS. Se crearon 20 modelos *ab initio* independientes con los programas DAMMIF²⁵² y GASBOR^{253,254}. Los modelos obtenidos se compararon y se seleccionó el más probable con el programa DAMSEL. Utilizando DAMSUP alineamos los modelos con el asignado como más probable y utilizando DAMAVER se mediaron los modelos alineados y se calculó el mapa de probabilidad. En base a este protocolo, se seleccionaron los modelos más probables, que fueron utilizados para construir los modelos finales utilizando las estructuras cristalográficas de CNNM2_{BAT}, CNNM4_{BAT}, CNNM2_{BAT} con MgATP, Complejo CNNM2_{BAT}-PRL-1 y CNNM4_{cNMP} (Códigos PDB 4YS, 6RS2, 4P1O, 5MMZ y 6G52 respectivamente). El valor de ajuste entre la curva teórica del modelo creado frente a la curva experimental de SAXS (X^2) se calculó con el programa FoxS²⁵⁵, integrado en Chimera²⁴⁶.

Para añadir los segmentos polipeptídicos que conectan el módulo Bateman con el dominio cNMP, así como los últimos 45 residuos desestructurados de la región C-terminal del dominio cNMP, (C-tail) presentes en el constructo CNNM4_{BAT}-cNMP-Ctail, se utilizó el programa CORAL²⁵⁴. El refinamiento de los modelos, se llevó a cabo con el programa SASREF²⁵⁶. Tanto CORAL como SASREF se encuentran integrados en el paquete ATSAS²⁵¹. Los modelos finales refinados se depositaron en la base de datos de SAXS “Small Angle Scattering Biological Data Bank” (SASBDB) con los códigos de acceso SASDER8, SASDEQ8, SASDES8, SASDEP8 y SASDEN8 para CNNM4_{cNMP}, CNNM4_{BAT}-cNMP-Ctail, CNNM4_{BAT}-cNMP-Ctail con MgATP, Complejo CNNM4_{BAT}-cNMP-Ctail-PRL-1 y Complejo CNNM4_{BAT}-cNMP-Ctail-PRL-1 con MgATP respectivamente. Los parámetros de colecta y estructurales de SAXS se exponen en las tablas 4.3 y 4.6 (resultados).

3.6. DISPERSIÓN DE LUZ MULTIÁNGULO (MALS)

La técnica conocida con el acrónimo MALS (por sus siglas en inglés “MultiAngle Light Scattering”) emplea la dispersión de luz por una macromolécula, y es una

Materiales y métodos

herramienta muy útil para determinar el peso y la presencia de diferentes estados oligoméricos de una macromolécula, independientemente de su forma. La técnica consiste en hacer incidir luz procedente de láseres a diferentes ángulos sobre una solución que contiene la macromolécula de interés.

En este estudio se analizó el peso molecular y el estado oligomérico de CNNM4^{BAT-cNMP-Ctail} y CNNM4^{cNMP} así como de los mutantes F631A en ambos constructos. Los experimentos se realizaron acoplando una columna de exclusión molecular Superdex 200 10/300 Increase (GE HealthCare) conectada a un sistema HPLC (Agilent), al detector de dispersión de luz DAWN-HELEOS y al detector del índice de refracción diferencial Optilab rEX (Wyatt Technology, Santa Bárbara, Ca, USA) (Sistema SEC-MALS). La columna se equilibró con un tampón que contenía 20mM HEPES pH 7.4, 200mMNaCl y 1mM TCEP. El tampón había sido previamente filtrado a 0.1µm. De cada muestra se inyectaron 100µl en concentraciones de 1 y 10 mg ml⁻¹. La concentración de proteína se varió con el objetivo de conocer su influencia en el estado oligomérico de la muestra. Se calibró el sistema SEC-MALS con albúmina de suero bovino (BSA, Sigma-Aldrich, B4287-1G) a una concentración de 1 mg mL⁻¹ preparado en el mismo tampón. La elución de la proteína a través de la columna se realizó a un flujo constante de 0.5 mL min⁻¹. La adquisición y análisis de los datos se realizó con el programa ASTRA (Wyatt technology).

4. Resultados

4.1. DISEÑO DE CONSTRUCTOS DE LAS PROTEÍNAS CNNM

La familia humana de factores homeostáticos de transporte de Mg^{2+} CNNM, está compuesta por cuatro miembros, CNNM1-4, cuya masa molecular y longitud de cadena polipeptídica varían desde 75-105 KDa, y 700-900 aminoácidos, respectivamente (Tabla 4.1.) CNNM3 es la proteína de menor tamaño, y CNNM1 la más grande. Los CNNMs son proteínas multimodulares formadas por al menos cuatro dominios independientes bien diferenciados interconectados entre sí por regiones flexibles. La región N-terminal está localizada en su mayoría extracelularmente, y presenta una región enriquecida en láminas β , que viene precedida por una hélice α -transmembranosa. A continuación, le sigue un dominio denominado DUF21 (*Domain of Unknown Function-21*), compuesto por tres o cuatro hélices transmembrana. La última de ellas, denominada hélice H0, es larga y conecta el DUF21 con la región intracelular de la proteína, que incluye dos módulos diferentes. El primero, conocido como *módulo Bateman*, está formado por dos motivos cistationina β -sintasa (dominios CBS) consecutivos, y representa la región más conservada entre todos los miembros de la familia CNNM. Aproximadamente cuarenta aminoácidos después del módulo Bateman, se encuentra el segundo dominio intracelular, conocido como dominio cNMP (por sus siglas en inglés “Cyclic Nucleotide MonoPhosphate binding domain”), cuya función se desconoce, aunque presenta cierta similitud con los dominios de unión a nucleótidos cíclicos CNBDs (“Cyclic Nucleotide Binding Domains”). Estos ejercen una función reguladora en otras proteínas, como los canales de potasio activados por la unión de un nucleótido cíclico (CNGs) o en las proteínas kinasas A y G (PKA y PKG respectivamente) mediante la unión a AMPc o GMPc^{9,257}. Por último, la región C-terminal de los CNNMs está constituida por una larga cola peptídica, cuya longitud varía entre los cuatro CNNMs y que se encuentra poco conservada a nivel de estructura primaria. La cola-, o *C-tail*, como es conocida, está probablemente desestructurada, y su función tampoco es conocida.

La naturaleza transmembranosa, multimodular, flexible y dinámica de los CNNMs, sujeta a cambios conformacionales drásticos (Corral-Rodríguez, 2014) ha convertido la cristalización de esta familia de proteínas en un gran desafío desde su descubrimiento en el año 2003 (Wang et al, 2003). Los intentos fallidos de nuestro laboratorio y de otros grupos por cristalizar las especies *full-length* correspondientes, nos invitó a buscar alternativas experimentales que permitieran abordar su estudio estructural. Aprovechando la identidad estructural independiente de cada uno de los módulos que constituyen estas proteínas, avalada por el conocimiento anterior de nuestro laboratorio con alguno de estos dominios (el módulo Bateman²⁰⁹), nuestra primera aproximación consistió en aplicar una

Resultados

estrategia de “Divide y Vencerás”, basada en el diseño de una batería de constructos, que comprenden diferentes regiones y dominios de la proteína, con el objetivo de cristalizarlos de manera independiente, para posteriormente ensamblar el “puzle” estructural completo de cada una de las proteínas (Fig. 4.1.).

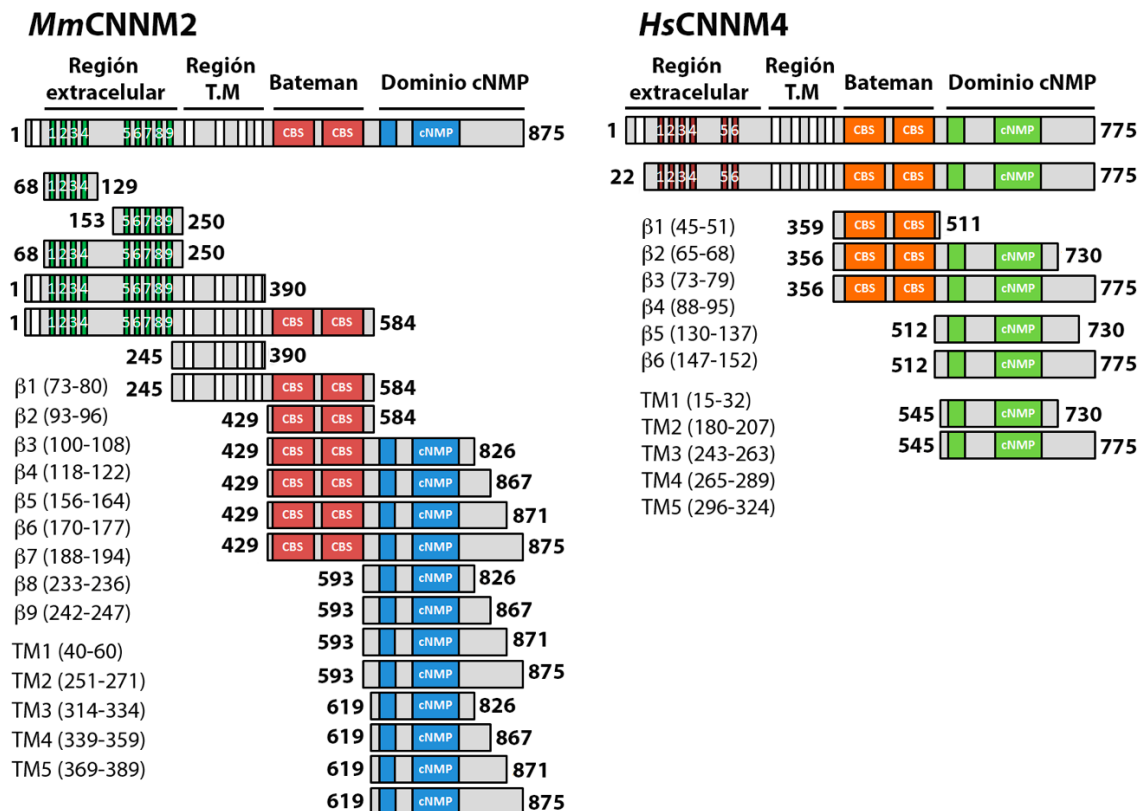


Figura. 4.1. Los constructos diseñados en este trabajo se muestran en la figura. TM se refiere a la región transmembrana. El módulo Bateman comprende los dos motivos CBS (Cistationina β-sintasa). Los residuos que comprenden las láminas β presentes en la región extracelular (rectángulos verdes y granates en CNNM2 y CNNM4 respectivamente) y las hélices transmembranosas (rectángulos blancos) se muestran a la izquierda de cada proteína. La proteína CNNM2 utilizada en este trabajo pertenece a la especie *Mus musculus* (*MmCnNM2*) y CNNM4 pertenece a la especie *Homo sapiens* (*HsCnNM4*).

El diseño de los constructos se realizó empleando el conocimiento cristalográfico previo sobre otras proteínas que contienen dominios CBS, así como las herramientas bioinformáticas disponibles online hoy en día, entre las que podemos mencionar Phyre2, Smartdatabase, Protter, Psipred y Blast (Protein). El análisis comparativo de la secuencia de aminoácidos de los CNNM humanos, y otras proteínas permitió establecer el grado de homología en distintas regiones de la cadena polipeptídica en regiones intra e intermodulares, así como residuos conservados, potencialmente implicados en el reconocimiento de posibles ligandos (por ejemplo nucleótidos) en algunas de estas regiones. Asimismo, permitió extraer conclusiones acerca de la homología entre miembros de la familia, y establecer qué proteínas comparten mayor homología, y por tanto una posible función similar. Por ejemplo, pudimos establecer que CNNM2 y CNNM4 son los homólogos más cercanos (tabla 4.1). El análisis de dominios equivalentes mostró

Resultados

que la mayor homología corresponde a regiones intramodulares, y la menor a los fragmentos intermodulares. El módulo Bateman de los cuatro CNNM representa la región más conservada, aproximadamente un 78%, (un 90% entre CNNM2 y CNNM4) (tabla 4.1). Por su parte, el dominio cNMP presenta una homología media de aproximadamente el 50% aunque entre CNNM2 y CNNM4 comparten un 60% de identidad (tabla 4.1). La alta similitud de secuencia de aminoácidos entre los miembros de la familia, especialmente entre CNNM2 y CNNM4, resultó relevante en el posterior estudio estructural, al permitir extrapolar muchas de las conclusiones obtenidas a diferentes miembros de la familia para los que no fue posible obtener una estructura cristalina.

Resultados

Tabla.4.1

hCNNM	Nterm (Media=19.4 %)	DUF21 (Media=45.1%)	Bateman (Media=77.7 %)	Conexión Bat-cNMP (Media =41.8%)	cNMP (Media=51,3%)	Cola-C (Media =25,8%)
hCNNM1	100 /20.2/26.7/14.0	100 /45.3/42.8/38.6	100 /81.8/70.8/79.1	100 /29.1/28.3/52.78	100 /56.7/45.9/52.3	100 /29.1/28.3/35.3
hCNNM2	20.2/ 100 /19.3/25.8	45.3/ 100 /33.1/79.0	81.8/ 100 /71.0/89.5	29.1/ 100 /37.8/61.11	56.7/ 100 /47.5/60.2	29.1/ 100 /15.1/27.5
hCNNM3	26.7/19.3/ 100 /10.4	42.8/33.1/ 100 /31.9	70.8/71.0/ 100 /74.5	28.3/37.84/ 100 /41.7	45.9/47.5/ 100 /45.1	28.3/15.1/ 100 /19.6
hCNNM4	14.0/25.8/10.4/ 100	38.6/79.0/31.9/ 100	79.1/89.5/74.5/ 100	52.78/61.1/41.7/ 100	52.3/60.2/45.1/ 100	35.3/27.5/19.6/ 100

La identidad de cada dominio con su región equivalente en el resto de los miembros de la familia CNNM, está expresada en porcentaje y separada por barras. El primer valor muestra el dominio que se esté comparando vs CNNM1, el segundo vs CNNM2 etc. La comparación “*consigo mismo*” (100%) se muestra en negrita para facilitar la interpretación.

Los residuos incluidos en cada región se indican a continuación:

CNNM1_Nterm:1-223; **CNNM1**_DUF21: 224-414; **CNNM1**_BAT: 415-568; **CNNM1**_ConexBAT-cNMP: 569-606; **CNNM1**_cNMP: 607-794; **CNNM1**_colaC: 795-950;
CNNM2_Nterm:1-250 ; **CNNM2**_DUF21: 251-431; **CNNM2**_BAT: 432-584; **CNNM2**_ConexBAT-cNMP: 585-621; **CNNM2**_cNMP: 622-820; **CNNM2**_colaC: 821-875;
CNNM3_Nterm:1-135 ; **CNNM3**_DUF21: 136-301; **CNNM3**_BAT: 302-452; **CNNM3**_ConexBAT-cNMP: 453-493; **CNNM3**_cNMP: 494-654; **CNNM3**_colaC: 655-707;
CNNM4_Nterm:1-178 ; **CNNM4**_DUF21: 179-358; **CNNM4**_BAT: 359-511; **CNNM4**_ConexBAT-cNMP: 512-547; **CNNM4**_cNMP: 548-724; **CNNM4**_colaC: 725-775

Capítulo 1.

Estructura de CNNM4

Resultados

En humanos, la proteína CNNM4 (código UniProtKB / Swiss-Prot Q6P4Q7) presenta dos isoformas de 775 y 262 aminoácidos respectivamente (la isoforma 1 carece de los primeros 513 residuos,), distribuidos en cuatro dominios estructuralmente independientes. La isoforma 1 (Mw= 86,6KDa, pI=5,75) contiene: (i) una región N-terminal (residuos 1-178) que incluye una hélice transmembranosa (residuos 15-32) y una región potencialmente enriquecida en láminas β , seguida de (ii) un dominio DUF21 (residuos 184-358) que incluye un motivo de cremallera de leucina (residuos 188-209) y cuatro hélices transmembrana (residuos 180-207; 243-263; 265-289 y 296-324), (ii) dos motivos consecutivos cistationina β -sintasa (CBS) (residuos 371-435 y 436-505 respectivamente), (iii) un motivo conservado "Cyclin box" (residuos 548-578)¹⁵³ y (iv) un dominio de unión a nucleótidos cíclicos (cNMP) (residuos 545-695

4.2. MÓDULO BATEMAN DE CNNM4 (CNNM4_{BAT})

La disponibilidad de la estructura cristalina del dominio Bateman de CNNM2 (CNNM2_{BAT})²⁰⁹, facilitó el diseño de un constructo cristalizabile que permitiera resolver la estructura de la región equivalente de CNNM4. La identidad a nivel de secuencia entre las dos proteínas esta región es del 90 % (Tabla 4.1.). El constructo diseñado, denominado CNNM4_{BAT}, contiene los dos dominios CBS (CBS1, CBS2) y la hélice H0 que los precede, y que les une al dominio transmembranoso DUF21. La razón de incluir la hélice H0, fue comprobar si la unión de ATP a CNNM4 afecta a su orientación, como ocurre en CNNM2²⁰⁹(apartado 1.4.2.2. Introducción), ya que cualquier cambio conformacional en esta hélice es potencialmente relevante en el mecanismo de transporte de Mg²⁺ a través de la membrana celular. El constructo CNNM4_{BAT} contiene los residuos 359-511, de los cuales, los aminoácidos 359-369 pertenecen a la hélice H0. Los motivos CBS1 y CBS2, están formados por los residuos 371-435 y 436-505, respectivamente. CNNM4_{BAT} presenta un peso molecular teórico de 18 KDa (calculado con el servidor <https://web.expasy.org/protparam/>) (Tabla 3.1. Materiales y métodos).

CNNM4_{BAT} se clonó en el vector pET101/D-TOPO con una cola de seis histidinas (6xHis) en el extremo N-terminal siguiendo el protocolo descrito en²⁵⁸. La cola de 6xHis se añadió con el objetivo de iniciar la purificación de la proteína mediante cromatografía de afinidad por Níquel, lo que permite obtener muestras de alta pureza desde el inicio de la purificación. El protocolo que se utilizó para purificar la proteína se detalla en el apartado 3.1.5. de Materiales y métodos.

4.2.1. Estructura cristalina de CNNM4_{BAT}.

La cristalización del constructo CNNM4_{BAT} fue realizada siguiendo el protocolo previamente descrito por nuestro laboratorio en ²³⁵. Brevemente, la proteína se cristalizó en un rango de 20 a 60 mg mL⁻¹ en 0.1M HEPES pH 7.5, 3.5-4 M NaCl, usando una proporción 1:1 entre la disolución de proteína y la solución del pocillo, con 1μL de proteína sobre 1μL de precipitante. Los cristales de CNNM4_{BAT} se congelaron utilizando 20% sucrosa como crioprotector y se midieron en las líneas ID14.1 e ID23.2 en el sincrotrón ESRF (Grenoble, Francia). Finalmente, se recogió un set de datos a una resolución de 3.6Å.

Los datos se indexaron, integraron y escalaron con los programas XDS²³⁸ y autoPROC²³⁹. Los parámetros de celdilla (a=91,4 b=141,4 y c=87,9; α=β=γ=90°) son compatibles con un sistema cristalino ortorrómbico. El estudio preliminar de la simetría del cristal, se analizó a partir de la función de autorotación (calculada con el programa MOLREP5 integrado en CCP4²⁵⁹). El plot a Chi=180, muestra tres ejes binarios ortogonales paralelos a los ejes a, b y c, respectivamente, consistentes con la clase de Laue mmm (Fig. 4.2).

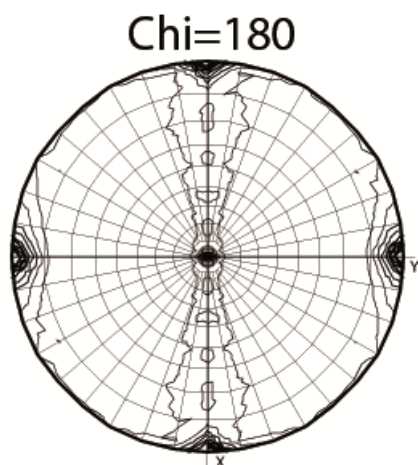


Figura.4.2. Función de Autorotación de CNNM4_{BAT}. La función muestra tres ejes de simetría binaria en Chi=180 perpendiculares a los ejes a, b y c respectivamente.

El Volumen de Matthews (V_M) calculado a partir de los datos de difracción²⁶⁰ (<https://csb.wfu.edu/tools/vmcalc/vm.html>) es de 3.97, 2.64 y 1.98 Å⁻³ Da⁻¹, para 2, 3 o 4 moléculas en la unidad asimétrica (a.u). Estos valores sugieren un contenido de solvente del 69, 54 y 38%, respectivamente. Teniendo en cuenta la fragilidad de los cristales y su limitado poder de difracción, estimamos que dos moléculas en la unidad asimétrica (probablemente un dímero de CNNM4_{BAT}) son el contenido más probable.

Resultados

La estructura cristalina de CNNM4_{BAT}, se determinó mediante la técnica de Reemplazamiento Molecular (MR), aprovechando la alta homología a nivel de secuencia de aminoácidos (94%) que existe entre CNNM4 y la región equivalente de CNNM2 (Tabla 4.1.), cuya estructura cristalina es conocida (Código PDB 4IYS)²⁰⁹. La técnica de MR permite obtener fases iniciales de la proteína diana a partir de un análisis comparativo del mapa de Patterson experimental de la proteína que se pretende resolver, y el mapa de Patterson teórico del modelo estructural conocido²⁶¹.

El análisis preliminar de los datos de difracción indicó la presencia de cuatro moléculas independientes en la a.u, que se disponían formando dos dímeros. El programa utilizado en el proceso de resolución estructural fue PHASER-MR integrado en el paquete PHENIX²⁴⁰. La obtención de fases se realizó considerando como posibles cualquiera de los grupos espaciales compatibles con la clase de Laue mmm: *P222*, *P222*₁, *P2*₁*2*₁*2*, *P2*₁*2*₁*2*₁, *C222*, *C222*₁, *F222*, *I222*, *I2*₁*2*₁*2*₁. El refinamiento del modelo final determinó que el grupo espacial correcto era *C222*. El modelado molecular se realizó con el programa COOT y el refinamiento de la estructura con el programa PHENIX REFINE²⁴⁴. Los parámetros estadísticos de difracción y del refinamiento se recogen en la tabla 4.2.

Como se esperaba, la estructura cristalina de CNNM4_{BAT} confirmó un módulo Bateman formado por dos motivos cistationina β -sintasa consecutivos (CBS1, residuos 371-435; CBS2, residuos 436-505) que presentan el plegamiento característico $\alpha\beta\alpha\beta\alpha$ observado en otras proteínas^{65,67}. Ambos motivos contactan entre sí a través de las hojas β formadas por las láminas β 1- β 3 en el motivo CBS1 y las láminas β 4- β 6 en el motivo CBS2 (Figura 4.3 arriba, izquierda). Las láminas β del motivo CBS1 son más cortas que las del CBS2. La hélice N-terminal HA1 es una hélice 3_{10} y la hélice H2 (que se sitúa a continuación de la lámina β 3) se divide en dos secciones, nombradas como H2A y H2B. Por su parte, la hélice H0, que conecta el dominio CBS1 con la región transmembrana, se empaqueta sobre las hélices H3 y H4 del motivo CBS2.(Figura 4.3). El módulo Bateman presenta una red de puentes de hidrógeno y puentes salinos entre cadenas laterales, tanto en el interior de los motivos CBS (D393-T396 en la región N-terminal de la hélice H1, S388-E412 entre las láminas β 1 y β 2, y T495-D498 entre la lámina β 5 y la hélice H4), como entre los motivos CBS1 y CBS2 (D426-Y445 entre las hélices H2 y HB y N360-E463 entre la hélice H0 y la hélice H3).

Resultados

Tabla 4.2. Datos estadísticos y de refinamiento de rayos-X

Proteínas	CNNM4 _{BAT}	CNNM4 _{CNMP}
Datos de colecta y procesamiento		
Línea de sincrotrón	ESRF, ID14-1	DIAMOND, I03
Longitud de onda (Å)	0.934	0.9794
Grupo espacial/ Código PDB	C2/4IY3	P3221/6G52
a (Å)	91.39	116.74
b (Å)	141.36	116.74
c (Å)	87.89	243.46
Moléculas por u.a.	4	9
Resolución (Å)	43.94 – 3.69 (3.76-3.69)	243.46 – 3.69 (3.99-3.69)
R _{sym} ^a	0.047 (0.437)	0.179 (1.661)
R _{meas} ^b	0.052 (0.485)	0.184 (1.707)
R _{pim} ^c	0.023 (0.209)	0.042 (0.387)
No. de reflexiones	62620	413463
No. de reflexiones únicas	11864	21343
I/σ	21 (3.4)	13.9 (2.8)
CC1/2	0.99 (0.91)	0.99 (0.87)
Complejidad (%)	98.7 (90.7)	99.7 (98.5)
Redundancia	5.3 (5.2)	19.4 (19.3)
Mosaicidad (°)	0.2	0.1
Estadísticas de refinamiento		
R _{work} ^d / R _{free} ^e	0.23/0.28	0.2844/0.3026
No. de átomos		
Protein	4567	9252
Ligand	-	-
Water	-	-
Media de los factores B (Å ²)		
Proteína	105,94	100
Ligandos	-	-
Moléculas de agua	-	-
Desviación cuadrática media		
Longitud de enlaces (Å)/Ángulos de enlaces (°)	0.004/0.683	0.003/0.748
Estadísticas de Ramachandran (%)		
Residuos en regiones favorables	97.5	99
Residuos en regiones permitidas adicionales	2.5	1
Residuos en regiones no permitidas	0	0

Cada set de datos se corresponde con un único cristal. La concha de mayor resolución se muestra entre paréntesis. $R_{sym}^a = \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$; $R_{meas}^b = \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$; $R_{pim}^c = R_{pim} = \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$. $R_{work}^d = \sum |F_o - F_c| / \sum F_o$. $R_{free}^e = \sum |F_o - F_c| / \sum F_o$, calculado utilizando un 5% de reflexiones aleatorias que no se incluyeron en el refinamiento

Resultados

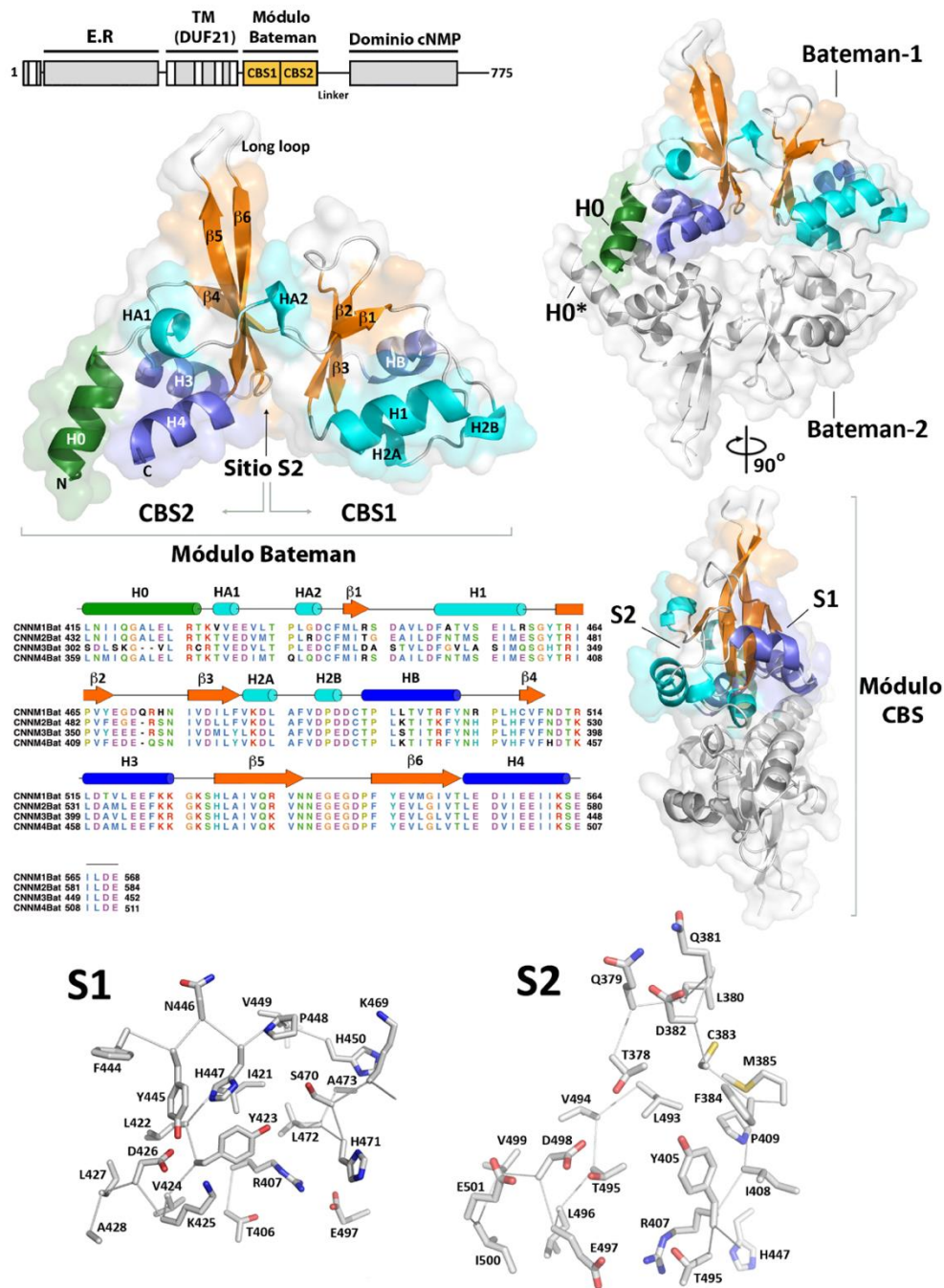


Figura. 4.3. Estructura del módulo Bateman de CNNM4. (Arriba, izquierda) CNNM4_{BAT} está constituido por dos motivos CBS consecutivos (CBS1 y CBS2). La región que conecta las láminas β5 y β6 forma un bucle largo ("Long loop") de ocho residuos. La hélice H0 conecta el módulo Bateman con la región transmembrana DUF21 (La distribución por dominios de la proteína se muestra encima de la estructura, E.R significa Región extracelular, TM (DUF21) se corresponde con la región transmembrana. *Linker* es el segmento de la cadena polipeptídica que conecta el módulo Bateman con el dominio cNMP (*Centro, derecha*) La proteína se asocia formando dímeros que se denominan *módulos CBS*. Las subunidades complementarias se muestran coloreadas y en gris, respectivamente. El módulo Bateman alberga dos cavidades denominadas S1 y S2 que se sitúan simétricamente a un lado y a otro de la molécula. (*Centro, izquierda*) Alineamiento de secuencia del módulo Bateman en las proteínas CNNMs humanas. Los elementos de estructura secundaria se muestran encima de la secuencia y han sido extraídos de la estructura cristalina del módulo Bateman de CNNM4. (*Abajo*). Residuos que forman las cavidades S1 y S2 en CNNM4_{BAT}. El residuo T495 en la cavidad S2 ocupa una posición equivalente a la treonina T568, que si se encuentra sustituida por una isoleucina, causa hipomagnesemia familiar (Stuiver et al. 2011).

Resultados

De forma similar a lo que se observa en dominios CBS de otras proteínas^{65,67}, el módulo Bateman de CNNM4 presenta dos cavidades principales simétricas, denominadas S1 (sitio 1) y S2 (sitio 2), que se localizan en la interfaz entre las hojas β de los dos motivos CBS (Figura 4.3, abajo). Es conocido que cavidades equivalentes unen derivados de adenina en otras proteínas. Por ejemplo, s-adenosilmetionina en la enzima CBS²⁶² o AMP, ADP o ATP en la proteína quinasa dependiente de AMP, AMPK²¹⁰. En CNNM4_{BAT}, la cavidad S1 se encuentra ocluida por cadenas laterales de residuos voluminosos (Y423, L472, R407) que impiden la unión de una molécula en su interior. Sin embargo, la cavidad S2 está expuesta y no presenta dicho impedimento estérico. Al contrario, presenta todas las características necesarias para albergar un derivado adenosílico: (i) un entorno hidrofóbico para acomodar el anillo de adenina (F384, M385, Y405, L493, V494, Fig.4.3.); (ii) un aspartato (D498) en la primera vuelta de la última α -hélice del dominio CBS2 y una treonina (T495) conservada en la última lámina β de dicho dominio para estabilizar la posición del el anillo de ribosa del adenosilo mediante la formación de puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilo del azúcar (Fig.4.3.)⁶⁷. Una característica poco frecuente (comentada con más detalle más abajo) de la cavidad S2, es la presencia de un *cluster* ácido localizado en el entorno del aspartato conservado, en la región N-terminal de la hélice H4 (E497, D498, E501). En otras proteínas implicadas en el transporte de iones, como MgtE, CorC o el canal de cloruro CLC-5^{51,62,73,209} (Fig 4.4) este *cluster* ácido está sustituido por residuos hidrofílicos de carga positiva o neutra. En CNNM4, el sitio S1, no presenta el *cluster* ácido, y su posición está ocupada por las cadenas laterales de los R407, K425, H471, y T406) (Figura 4.3).

La estructura del módulo Bateman de CNNM2 unido a ATP fue resuelta en el año 2014 mediante cristalografía de Rayos-X en nuestro laboratorio. Como se muestra en esa estructura²⁰⁹, el ATP se une exclusivamente al sitio S2 de CNNM2, que como hemos comentado presenta características únicas que la distinguen de los sitios de unión a nucleótidos de dominios CBS presentes en otras proteínas. A modo de resumen, mencionaremos que las cavidades S1 o S2 de un módulo Bateman que une nucleótidos están generalmente compuestas por tres bloques estructurales: (1) la región flexible que conecta la pequeña hélice α HA2 que precede a la lámina β 1 del motivo CBS1; (2) La lámina β 2 del motivo CBS1; y (3) La lámina β 6 del motivo CBS2 junto con las primeras dos vueltas de la hélice α siguiente (H4) (Fig. 4.4.). Los primeros dos bloques proporcionan una región hidrofóbica que acomoda y orienta el anillo de adenina, fijando la orientación de la ribosa en la cavidad. Entre los residuos involucrados se encuentran una fenilalanina conservada, localizada en la región que precede a la lámina β 1 (F440,

Resultados

F457, F325, and F384 en CNNM1-4, respectivamente) (Fig. 4.4.) y una tirosina, que se sitúa en la región que precede a la lámina $\beta 2$ (Y461, Y478, e Y405 en CNNM1, 2, y 4, respectivamente (en CNNM3 el residuo equivalente es H346) (Fig. 4.4.).

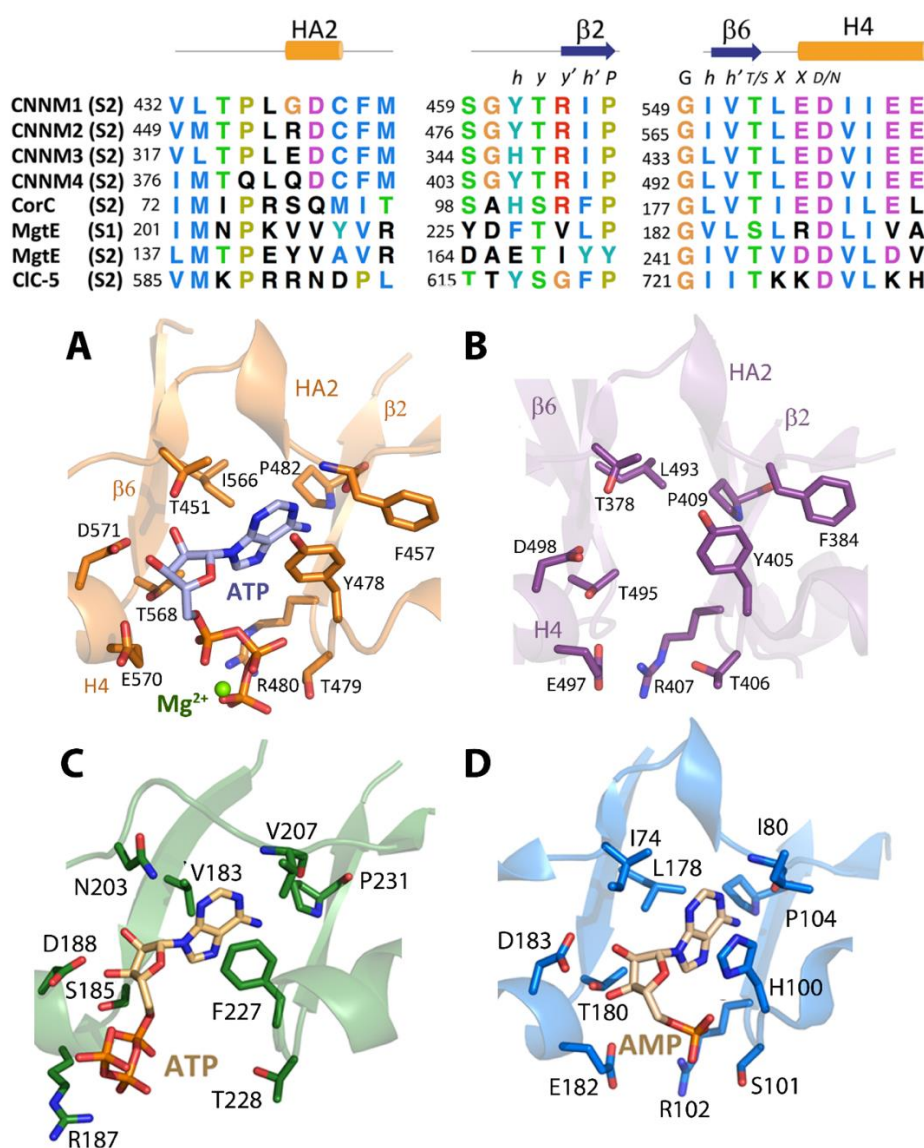


Figura 4.4. (A, B, C y D) muestran la cavidad de unión a nucleótidos en CNNM2, CNNM4, MgTE y CorC respectivamente. En los CNNMs y CorC el nucleótido se une a la cavidad S2 mientras que en MgTE se une en la cavidad S1. Los residuos principales involucrados en la interacción con el nucleótido se muestran en detalle. Arriba se muestra un alineamiento de los tres bloques que conforman las cavidades del sitio S2 (y S1 en MgTE). El motivo conservado *h y y' h' P* (donde *h* es hidrofóbico, y es cualquiera, y *P* es prolina) estabiliza el anillo de adenina y favorece la presencia de nucleótidos derivados de adenina. Los residuos conservados T568 y D571 interactúan con el hidroxilo del anillo de ribosa y pertenecen al motivo conservado *G h h' T/S X X D/N* (donde *h* es hidrofóbico y *X* es cualquier residuo). La repulsión electrostática ejercida por los residuos E570, D571, y E572 se neutraliza por la presencia de Mg²⁺. En MgTE la treonina conservada del motivo *G h h' T/S X X D/N* se sustituye por una serina, y el glutamato conservado (E570 de CNNM2) está sustituido por una arginina, la cual interactúa con la cadena polifosfato del ATP.

Por otro lado, la orientación del anillo de ribosa del ATP se estabiliza principalmente gracias a tres residuos: El primero es una treonina conservada que pertenece al primer bloque estructural, y que precede a la hélice HA2 (T434, T451, T319 y T378 en CNNM1 -

Resultados

4 respectivamente) (Fig.4.4.). El segundo es otra treonina conservada (T552,T568, T436 y T495 en CNNM1-4 respectivamente) localizada en la región final de la lámina $\beta 6$ en el tercer bloque (Fig.4.4.). Por último el tercer residuo es un aspartato también conservado (D555, D571,D439 y D498 en CNNM1-4 respectivamente), que se localiza en la primera vuelta de la última hélice α (H4) del motivo CBS2 (tercer bloque estructural) (Fig.4.4.). Estos tres aminoácidos forman una extensa red de puentes de hidrógeno con el hidroxilo de la ribosa, que, junto con el bolsillo hidrofóbico mencionado anteriormente, orientan el motivo de adenosilo dentro de la cavidad. El tercer bloque estructural de la cavidad, es el que marca la diferencia en términos de selección de nucleótido y afinidad de unión en las proteínas homólogas. Por ejemplo, tanto en los CNNMs como en CorC, este bloque incluye una región rica en residuos ácidos en las primeras dos vueltas de la hélice H4. Esta región, formada por los residuos E497, D498, E501 en CNNM4 (En CNNM2 estos residuos son E570, D571 y E574, los equivalentes en el resto de CNNMs y CorC se muestran en la figura 4.4), ejerce una repulsión electrostática que no favorece la interacción con grupos cargados negativamente como la cadena polifosfato del ATP (Fig.4.4.). Una reducción en la carga negativa del ligando, como por ejemplo un menor número de fosfatos, o alternativamente, la presencia de cationes divalentes unidos al nucleótido (por ej. MgATP) neutraliza la repulsión y por tanto incrementa la afinidad de la proteína por el nucleótido. Esto no solo explica la interacción dependiente de Mg^{2+} observada en CNNM2^{155,209}, sino también la mayor afinidad observada por AMP que por ATP²⁰⁹. La reducción de la repulsión electrostática podría también justificar el hecho de que solo se haya conseguido resolver la estructura de CorC unida a AMP y no el complejo con ATP correspondiente (Código PDB 5YZZ⁵¹). Al contrario que las proteínas CNNMs y CorC, en MgtE y CLC-5, en la posición del residuo E570 de CNNM2, hay una arginina o una lisina (R187 y K726 respectivamente), que estabilizan la cadena de polifosfato y, por tanto, favorece la interacción con ATP en estas proteínas (Fig.4.4.). Pese a que no se ha resuelto la estructura de CNNM4_{BAT} en presencia de nucleótidos unidos, los residuos del sitio S2 implicados en la interacción con MgATP en CNNM2 se encuentran estructuralmente conservados en CNNM4, lo que sugiere que CNNM4_{BAT} también puede unir este ligando (Fig.4.4.). La unión de ATP y Mg^{2+} al módulo Bateman de CNNM4 se demostró en estudios previos del laboratorio, mediante Resonancia magnética nuclear (RMN). Las titulaciones de RMN mostraron que CNNM4_{BAT} interacciona de forma muy débil con iones Mg^{2+} ($K_D > 10^{-2}M$) y con ATP, cuya constante de afinidad se encuentra en el rango de 10^{-3} - $10^{-2}M$, lo que se sitúa en el rango de concentración del ATP intracelular (1-10mM). Sin embargo, la adición de Mg^{2+} junto al ATP, reforzó y estabilizó los efectos observados en el espectro tras la adición de ATP, lo que se interpretó como que la unión

Resultados

de Mg^{2+} favorece la unión del ATP. Basándonos en la estructura cristalina de CNNM2_{BAT} en presencia de MgATP y la alta homología de secuencia y estructura con CNNM4_{BAT}, concluimos que los iones Mg^{2+} también neutralizarían la repulsión electrostática entre los residuos ácidos del sitio S2 de CNNM4_{BAT}, permitiendo así la unión del ATP.

De forma similar a su homólogo CNNM2²⁰⁹, CNNM4_{BAT} se asocia consigo mismo formando un dímero con forma de disco denominado *módulo CBS*, que presenta una disposición paralela, es decir, los extremos N y C-terminal de módulos Bateman complementarios se encuentran orientados hacia el mismo lado del disco, y no en lados opuestos como en el caso de un *módulo CBS antiparalelo*^{65,67}. Al formar el módulo CBS, los motivos CBS1 y CBS2 se empaquetan con su subunidad equivalente en la proteína complementaria (Fig. 4.3). En el módulo CBS de CNNM4 la interfaz entre subunidades en la región del motivo CBS1 presenta una red de interacciones hidrofóbicas (Fig. 4.5.).

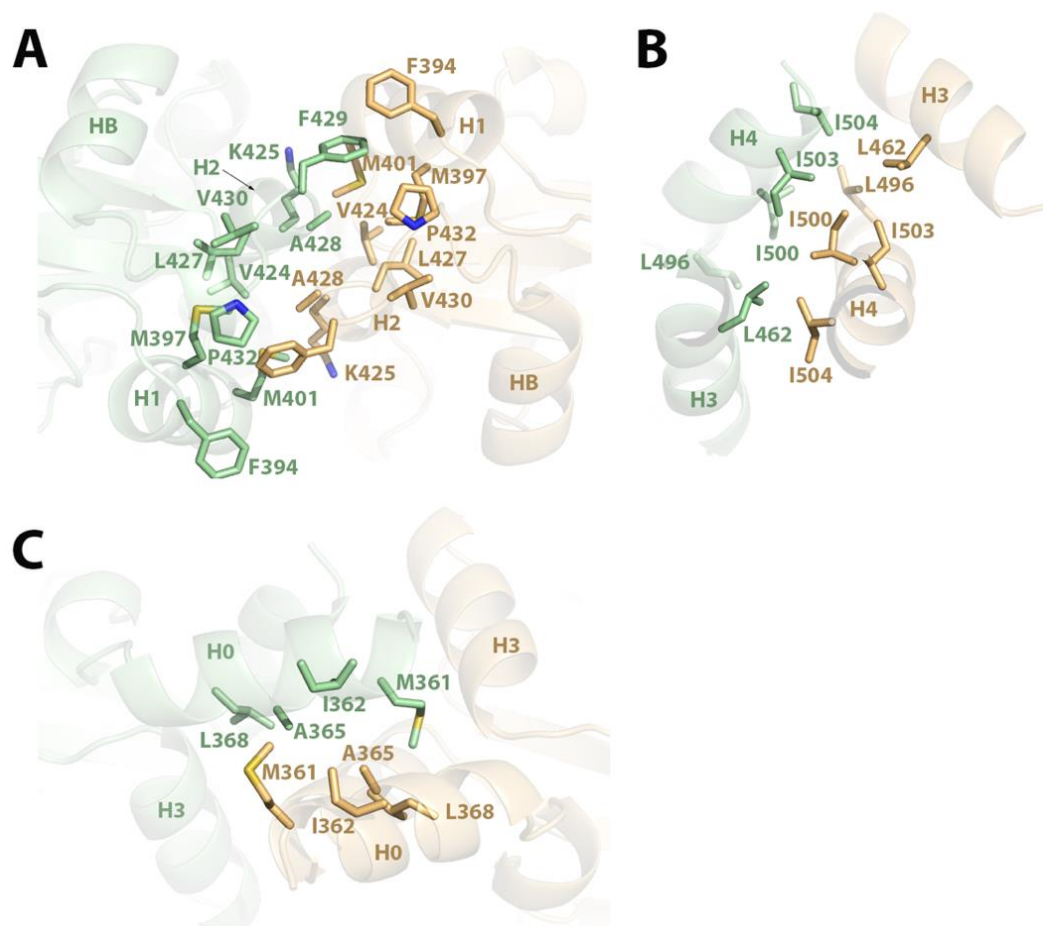


Figura 4.5. Interacciones que estabilizan el módulo CBS de CNNM4. A, B y C representan las interacciones presentes en el módulo CBS de CNNM4. Se corresponden con las interacciones entre motivos CBS1, CBS2 y H0 respectivamente de subunidades complementarias (en verde y naranja claros).

Resultados

El bolsillo hidrofóbico formado por las cadenas laterales de las hélices H1 (F394, M397, M401) y H2 (V424, K425, L427, V430, P432) acomoda las cadenas laterales de residuos presentes en la hélice H2 de la subunidad CBS1 complementaria (como por ejemplo A428 y F429) (Fig.4.5.). Por otro lado, las interacciones entre los motivos CBS2 presentan contactos recíprocos entre las hélices H3 y H4 de la subunidad complementaria, y H4 y H3 de la otra subunidad (H3-H4*/ H4-H3*). Estos contactos implican al residuo L462 de la H3, y a los residuos L496, I500, I503, I504 de la hélice H4 (Fig.4.5.). Tras la dimerización, las hélices H0 de módulos Bateman complementarios se cruzan y participan en la interfaz entre motivos CBS2 a través de los residuos N360, M361, I362, A365, y L368 (Fig.4.5.).

Inesperadamente, el módulo CBS de CNNM4 presenta una conformación intermedia (“*semitwisted*”) en ausencia de ATP. Esta conformación semialabeada es intermedia entre las dos conformaciones descritas para CNNM2: *alabeada* o “*twisted*” (con forma de “Y”) en ausencia de fosfonucleótidos (AMP, ADP o ATP) y “*plana*” o “*flat*”, tras la unión de MgATP²⁰⁹. Las diferencias se muestran en la figura 4.6.

La presencia de densidad electrónica residual en los extremos de los dominios CBS1, cerca de un *cluster* ácido formado por los residuos D431, D433 y D434 (hélice H2B) (Fig. 4.3.), que nosotros atribuimos a la probable presencia de uno o varios cationes metálicos (probablemente iones Na⁺ presentes en la solución de cristalización) puede explicar la conformación “*semitwisted*” que adopta el módulo CBS de CNNM4_{BAT} en los cristales. Es razonable pensar que la interacción de iones Na⁺ con dichos *cluster* ácidos, contribuye a neutralizar las cargas repulsivas que en su ausencia alejarían los dominios CBS1 de la subunidades complementarias en el módulo CBS (Fig. 4.7.), que conduciría a la conformación *twisted* que se observa en la estructura de CNNM2²⁰⁹. Desafortunadamente, la resolución de los datos de difracción no permite confirmar de forma inequívoca la presencia de iones Na⁺ en la estructura.

Resultados

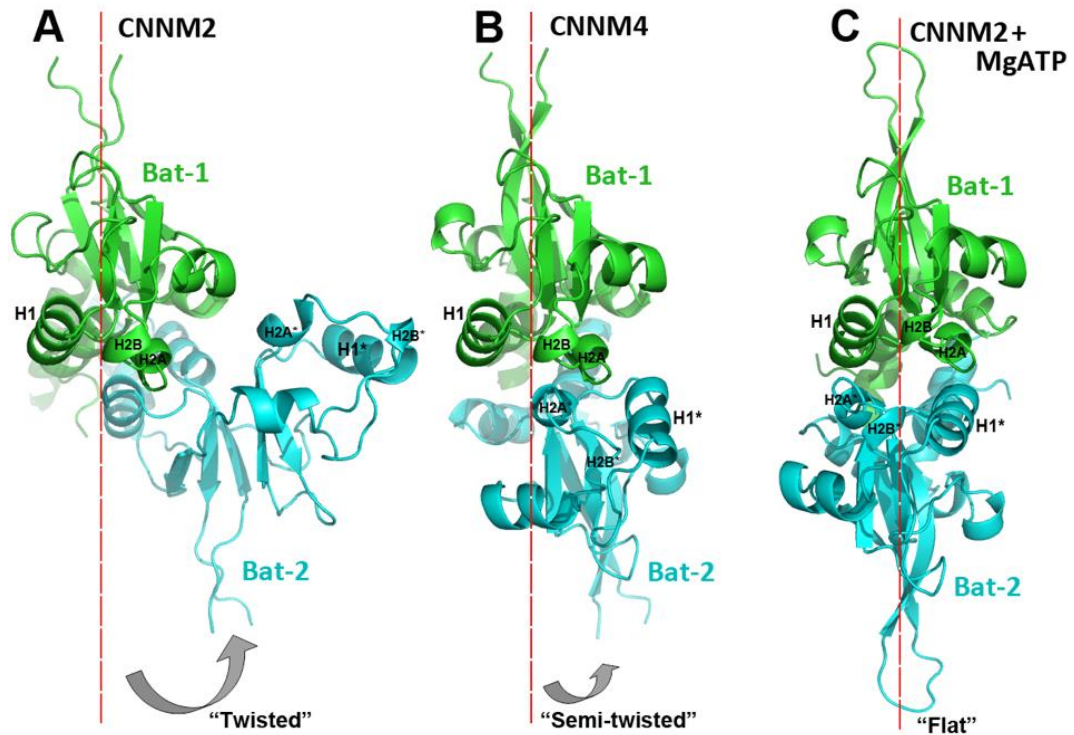


Figura.4.6. Cambios conformacionales observados en módulos CBS. Hasta la fecha, se han descrito tres conformaciones diferentes en el módulo CBS (Dímeros de módulos Bateman, en verde y azul respectivamente) en proteínas CNNMs. CNNM2 adopta dos conformaciones diferentes, (A) "Twisted" en ausencia de ligandos y donde cada módulo Bateman rota respecto del complementario (el plano que representa el eje entre láminas β de un módulo Bateman está representado mediante una línea roja) y "Flat" (C) cuando une MgATP en el sitio S2 de cada subunidad, y donde los dos módulos Bateman se encuentran alineados en el mismo plano. (B) CNNM4 adopta una conformación "semi-twisted" la cual se corresponde con un estadio intermedio entre las conformaciones (A) y (C).

En CNNM2, la carga negativa de los residuos D504, D506 y D507 en la hélice H2B ejerce una repulsión electrostática entre motivos CBS1 complementarios que provoca la conformación "twisted" (Fig.4.7.) que presenta CNNM2_{BAT} en ausencia de ligandos²⁰⁹. La unión de cationes Mg²⁺ a esa región de CNNM2_{BAT}²⁰⁹ neutraliza la repulsión electrostática y favorece el cambio conformacional que hace que CNNM2_{BAT} adquiera la conformación "flat". Datos de RMN, obtenidos en colaboración con el Dr. Tammo Diercks de CIC bioGUNE, muestran que CNNM4_{BAT} une ATP de forma Mg²⁺ dependiente, de la misma manera que el módulo Bateman de CNNM2 (Fig 4.4.).

Resultados

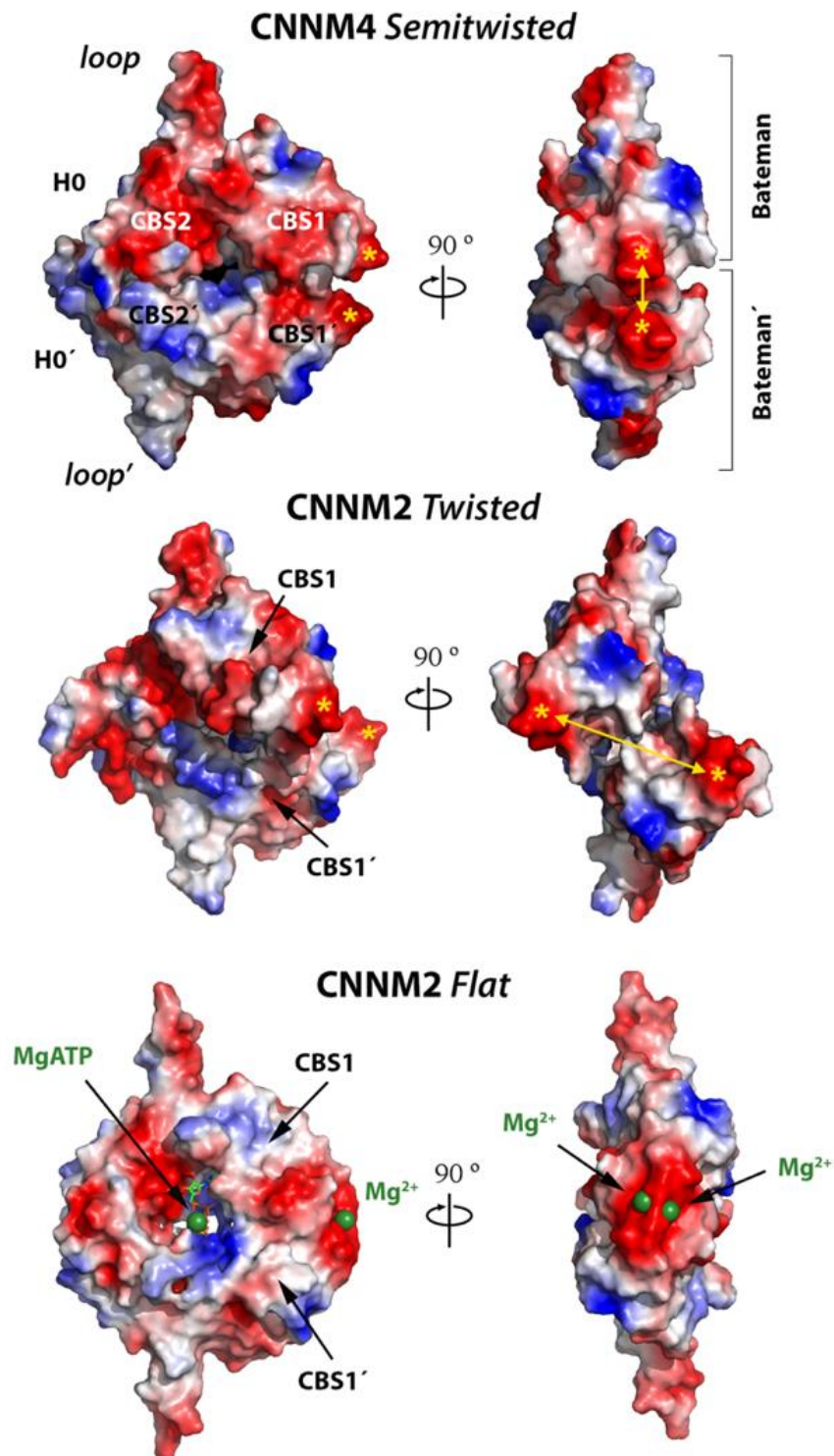


Figura 4.7.. Se muestra la superficie electrostática del módulo CBS de CNNM4 (arriba) y de CNNM2 (abajo), este último tanto en ausencia (*twisted*) como en presencia (*flat*) de MgATP. Los extremos de los motivos CBS1 complementarios (hélice H2B, asterisco amarillo) presentan una región rica en cargas negativas (rojo) que ejercen una repulsión electrostática. Esta repulsión de cargas en CNNM2 hace que el módulo CBS adquiera una conformación "*twisted*". El Mg²⁺ se une en esa región del motivo CBS1, neutralizando la repulsión de cargas y promoviendo la conformación *flat* de CNNM2_{BAT}. En CNNM4_{BAT}, probablemente debido a la presencia de iones Na⁺ en la condición de cristalización, se neutraliza la repulsión de cargas y la conformación es "*semitwisted*". Las cargas positivas se representan en azul y las neutras en blanco

4.3. ESTRUCTURA DEL DOMINIO CNMP.

La estructura tridimensional de los dominios cNMP de los CNNMs se desconocía al inicio de esta tesis doctoral, si bien el análisis comparativo de sus secuencias de aminoácidos había llevado a clasificarlos como potenciales ortólogos de dominios de unión a nucleótidos cíclicos (CNBDs), similares a los que contienen otras proteínas de función no relacionada. Entre ellas se encuentran las kinasas PKA y PKG²⁵⁷ y los canales iónicos activados por hiperpolarización y nucleótidos cíclicos HCN y CNG respectivamente^{8,263}. En el caso de los CNNM humanos, la estructura primaria dentro de la familia está conservada en un 50% de media (Tabla 4.1), alcanzando el valor más alto (60%) entre CNNM2 y CNNM4, y el más bajo (45 %) entre CNNM3 y CNNM4 (Tabla 4.1). La carencia de un modelo tridimensional adecuado impidió el uso de técnicas de remplazamiento molecular en la elucidación de la estructura cristalina y obligó a utilizar técnicas alternativas no dependientes de modelo, como la dispersión anómala simple (SAD) o múltiple (MAD). En el caso particular de CNNM2 y CNNM4, la alta identidad entre ambas proteínas ha permitido extrapolar muchas de las conclusiones estructurales y funcionales obtenidas para uno de ellos (CNNM4). Como se describe más adelante, la información obtenida ha permitido reconstruir un modelo tridimensional que engloba la región intracelular completa.

Como se menciona en el apartado 4.1., nuestro estudio cristalográfico comenzó con el diseño de constructos estables, potencialmente cristalizables, que incluyeran el dominio cNMP. La inclusión o delección de pequeños segmentos peptídicos a ambos lados del módulo cNMP se decidió en base a la predicción de estructura secundaria en dichas regiones satélites, empleando las herramientas bioinformáticas disponibles online (https://molbiol-tools.ca/Protein_secondary_structure.htm). El objetivo de este análisis preliminar fue determinar con la mayor precisión posible los límites del módulo cNMP en cada una de las proteínas de interés, evitando así una posible alteración de sus elementos secundarios (α -hélices, láminas β) y la desestabilización del plegamiento general de la proteína. Los constructos que se diseñaron del dominio cNMP de CNNM2 y CNNM4 (Fig.4.1.) fueron los siguientes (los residuos correspondientes se indican entre paréntesis en subíndice): CNNM2₍₅₉₃₋₈₂₆₎; CNNM2₍₅₉₃₋₈₆₇₎; CNNM2₍₅₉₃₋₈₇₁₎; CNNM2₍₅₉₃₋₈₇₅₎; CNNM4₍₅₁₂₋₇₃₀₎; CNNM4₍₅₁₂₋₇₇₅₎; CNNM4₍₅₄₅₋₇₃₀₎; CNNM4₍₅₄₅₋₇₇₅₎. Los constructos diseñados en base a este criterio, se sometieron posteriormente a un análisis de cristalizabilidad usando el servidor XtalPred (<http://xtalpred.godziklab.org/XtalPred-cgi/xtal.pl>). Este software emplea estadísticas obtenidas de proteínas microbianas de tipo salvaje no secretadas y está optimizado para identificar los objetivos de cristalización más prometedores de grandes

Resultados

familias de proteínas. XtalPred también es útil en el diseño de constructos, aunque la clase de cristalización en sí misma no suele ser un criterio suficiente para encontrar límites precisos en la cadena de aminoácidos. La predicción se realiza combinando las probabilidades de cristalización individuales calculadas en base a ocho parámetros de las proteínas diana en una única puntuación (*score*) de cristalización. Basándose en esta puntuación, se asigna la proteína analizada a una, de entre cinco clases de cristalización. Cada clase representa una tasa de éxito probable de cristalización frente a la base de datos TargetDB. Los constructos diseñados del dominio cNMP de CNNM2 y CNNM4 obtuvieron en los ocho casos un *score* de cristalización de 5 que se corresponde con la clase de cristalización menos prometedora. Aún así, seleccionamos tres de los constructos, CNNM4₍₅₄₅₋₇₃₀₎, CNNM4₍₅₄₅₋₇₇₅₎ y CNNM2₍₅₉₃₋₈₇₅₎ para sobreexpresarlos, purificarlos y comprobar si alguno era susceptible de cristalizar experimentalmente.

4.3.1. Sobreexpresión y purificación del dominio cNMP de CNNM2 y CNNM4.

Los constructos seleccionados se clonaron en el vector pHis-Parallel2 que proporciona una cola de seis histidinas en el extremo N-terminal. La adición de una cola 6xHis se realizó con el objetivo de iniciar la purificación de la proteína mediante cromatografía de afinidad por níquel. A continuación de la cola 6xHis se añadió una secuencia de reconocimiento de la proteasa TEV lo que nos permite eliminar la cola de histidinas del constructo. El protocolo general de purificación de estos constructos consistía en, después de lisar las bacterias (Apartado 3.1. Materiales y métodos) se realizaba una primera cromatografía de afinidad por níquel, seguida del corte de la cola 6xHis y a continuación se realizaba una segunda cromatografía de afinidad por níquel. De este modo, la cola 6xHis, la proteasa TEV (que también contiene una cola 6xHis) y las proteínas presentes en el lisado bacteriano que se unen de forma inespecífica a la columna de afinidad se vuelven a retener en la columna mientras que nuestro constructo de interés no se une. Por tanto, obtenemos una muestra bastante pura solo con dos cromatografías de afinidad, lo que reduce el tiempo de purificación y aumenta el rendimiento de la misma. A continuación, realizamos una cromatografía de exclusión molecular con el objetivo de separar diferentes poblaciones o posibles agregaciones de la proteína y posibles proteínas contaminantes que hayan podido permanecer en la solución (Fig.4.8.).

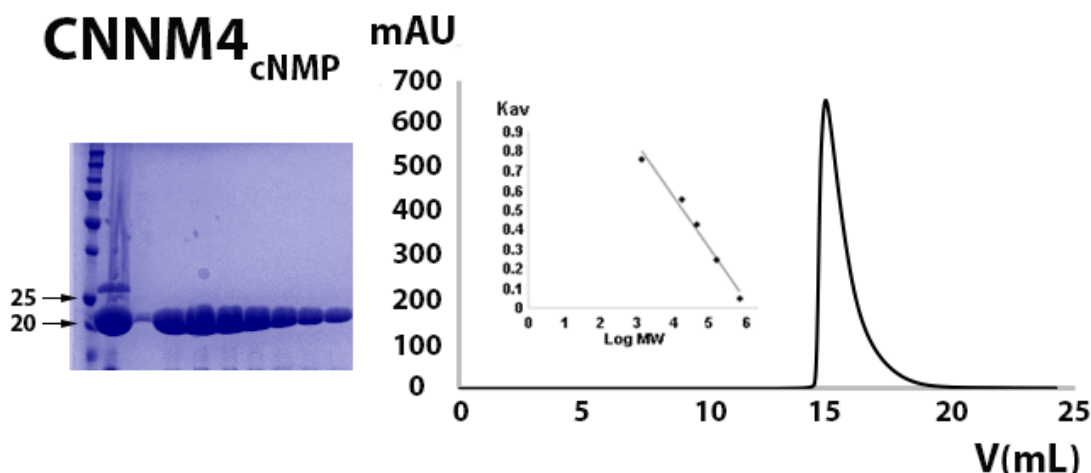


Figura. 4.8. (Izquierda), SDS-PAGE del último paso de purificación (Columna de exclusión molecular) de CNNM4_{cNMP}. El primer carril del gel muestra los marcadores de peso molecular, donde se resaltan el de 25 y 20 KDa (Mw CNNM4_{cNMP}=20.9 KDa). El segundo carril se corresponde con la solución que se inyecta en la columna de exclusión molecular y el resto de carriles muestran fracciones eluidas de la columna, donde se observa la alta pureza obtenida en las muestras. (Derecha) Perfil de elución de CNNM4_{cNMP} de la cromatografía de exclusión molecular Superdex200 10/300 Increase (GE Healthcare). A la izquierda del pico se muestra la curva de calibración de la columna de exclusión molecular.

4.3.2. Cristalización del dominio cNMP.

Los constructos seleccionados para llevar a cabo los ensayos de cristalización del dominio cNMP de CNNM2 y CNNM4 fueron: CNNM2₍₅₉₃₋₈₇₅₎, CNNM4₍₅₄₅₋₇₃₀₎ y CNNM4₍₅₄₅₋₇₇₅₎. (Fig 4.1). De ellos, CNNM4₍₅₄₅₋₇₃₀₎ (de ahora en adelante denominado CNNM4_{cNMP}) es el único que no incluye la cola-C, y también el único que rindió cristales de calidad suficiente para iniciar el estudio cristalográfico. El fracaso en la cristalización de los otros dos constructos se atribuyó a la flexibilidad y probable carencia de estructura definida de la cola C. Debido a la carencia de un modelo tridimensional adecuado para la resolución estructural mediante MR, se decidió utilizar CNNM4_{cNMP} marcado con selenometionina, con el objetivo de utilizar el método de dispersión anómala simple en el momento de la resolución estructural

Experimentalmente, los estudios de cristalización se iniciaron con un cribado a gran escala (*High throughput screening*) empleando todas las soluciones comerciales (*screens*) disponibles en la plataforma de Rayos-X, que incluye aproximadamente unas 2000 condiciones diferentes que exploran variaciones en el tipo de precipitante (sales, polietilenglicoles, aminas y alcoholes), aditivos (sales inorgánicas y orgánicas) y detergentes, además de búferes tamponados a diferentes pHs (Apartado 3.3 Materiales y métodos, Tabla 3.2.). Uno de los parámetros clave controlado durante el estudio fue la temperatura, limitada a 4°C o a 18°C en salas atemperadas del CIC bioGUNE. El elevado número de condiciones del cribado requirió la asistencia automática de robots de manejo

Resultados

de líquidos (TECAN EVO) y nanodispensadores (Mosquito), que agilizaran el proceso. Ambos robots forman parte de la plataforma de rayos X de CIC bioGUNE. Los primeros hits de cristalización se obtuvieron en 20 de las 96 condiciones que ofrece el *screen* PEG ION 1 y 2 de la empresa Hampton Research (<https://www.hamptonresearch.com/>)(Fig 4.9). La técnica empleada fue la de difusión de vapor por gota sentada, en placas de 96 pocillos MRC a una temperatura de 18°C.

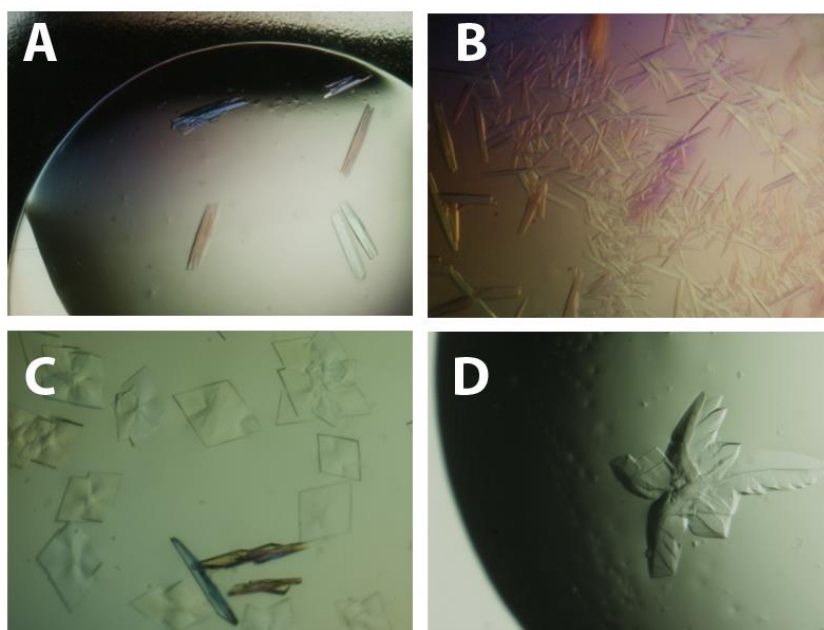


Figura. 4.9. A, B, C y D muestran cristales crecidos con PEG 3350 y cloruro de litio, acetato de sodio, citrato de potasio y fluoruro de sodio respectivamente procedentes del *screen* comercial PEG ION 1 y 2.

La optimización de las condiciones iniciales se realizó en placas de 24 pocillos por el método de gota colgante, variando la concentración de la proteína y del precipitante, el peso molecular del polietilenglicol (desde 400 a 20K g mol⁻¹), el pH, la fuerza iónica de las soluciones salinas, y la adición aditivos y detergentes (*screens* de Hampton Research). Los cristales optimizados se congelaron utilizando diferentes tipos de crioprotectores (alcoholes, sucrosa, agarosa y aceite de silicona entre otros, presentes en el *screen* CryoPro de Hampton Research) (Apartado 3.3, Materiales y métodos) y se almacenaron en nitrógeno líquido hasta la colecta de datos de difracción de rayos X en instalaciones sincrotrón. En contraste con el alto número de condiciones de cristalización, la calidad de difracción de los cristales obtenidos no pudo mejorarse más allá de 5 o 6 Å de resolución. La utilización de técnicas de microsemillaje (*microseeding*)²³⁶ tampoco mejoraron el poder de difracción de los cristales, que a pesar de una buena morfología y tamaño (entre 0.5-1 mm los más grandes) siguieron difractando en un rango aproximado de 5Å. La realización de un nuevo cribado, mediante la técnica de gota sentada en placas de 96 pocillos, permitió obtener cristales en 0.5M Formiato de sodio, 5% de PEG 3350 y 0.1M

Resultados

Tris pH 7.2, a una concentración de proteína de 8mg mL^{-1} . Los cristales se congelaron en 20% (v/v) de glicerol como agente crioprotector mediante inmersión rápida (*flash freezing*) en nitrógeno líquido. Las dificultades encontradas para optimizar la morfología y calidad de los cristales, se reprodujo también en la obtención de un set de datos de difracción de calidad que permitiese avanzar en el estudio estructural. A pesar del enorme esfuerzo experimental (se testaron varios centenares de cristales) sólo pudimos obtener un único set de datos con resolución suficiente (3.34 \AA) para abordar la determinación estructural (Fig 4.10).

4.3.3. Estudio cristalográfico preliminar de CNNM4_{cNMP}.

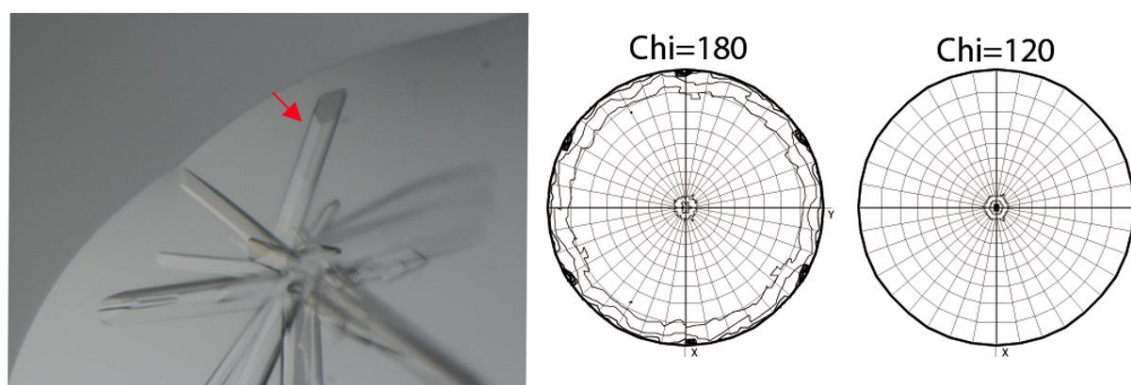


Figura. 4.10. (Izquierda) Imagen del cristal con el que resolvimos la estructura del dominio cNMP de CNNM4 (Flecha roja). (Derecha) Función de autorotación del dominio cNMP, de donde se extrae la presencia de un eje ternario (Chi=120) y de ejes binarios (Chi=180) cada 60° , lo que es indicativo de la clase de Laue $-3m$.

La recogida de datos se realizó en la línea I03 del sincrotrón Diamond light source (DLS) (Didcot, UK), y aportó 3600 imágenes con una exposición por imagen de 0.08 segundos y una oscilación Ω de 0.1° . La longitud de onda seleccionada para realizar la recogida de datos (0.9794 \AA) fue determinada experimentalmente calculando la curva experimental de un *scan* de fluorescencia de selenio (Tabla 3.3. Materiales y métodos). El factor de *scattering* de un átomo (expresado por la ecuación $f(\theta, \lambda) = f_0(\theta) + f'(\lambda) + if''(\lambda)$) tiene tres componentes: el primer término depende del ángulo de *scattering* o ángulo de Bragg, mientras que los dos restantes dependen de la longitud de onda (λ). Los dos últimos términos representan la difracción anómala que tiene lugar cerca del borde de absorción del átomo (en este caso los átomos de selenio), cuando la energía de la radiación es suficiente para promover un salto electrónico desde una capa atómica interna. El factor de dispersión [$f'(\lambda)$] reduce el factor de *scattering* normal, mientras que el término anómalo [$if''(\lambda)$] sufre un desfase (avance) de 90° . Este desfase, rompe la ley de Friedel, que establece que la intensidad de las reflexiones relacionadas por simetría h, k, l y $-h, -k, -l$, son equivalentes, dando lugar a diferencias anómalas que pueden

Resultados

emplearse matemáticamente para localizar la posición de los *scatterers* (selenios en el caso de proteínas marcadas con selenio-metioninas) que han provocado este efecto. Es importante destacar que el *scattering* anómalo es mayor para átomos con un elevado número atómico, como el selenio (Se), y menor para átomos con menor número de electrones como el azufre (S) o el fósforo (P), siendo prácticamente despreciable para átomos como el carbono (C), el nitrógeno (N), o el oxígeno (O), principales componentes de los aminoácidos de las proteínas. Un típico experimento de dispersión anómala implica la recogida de datos en el pico de absorción del *scatterer* anómalo (mayor valor de f''), otro en el punto de inflexión de dicha curva (menor f''), y otro en una longitud de onda remota situada por encima del borde de absorción, donde f' es prácticamente cero y f'' muy grande. La técnica de dispersión anómala simple (SAD) se realiza colectando un único set de datos en el pico de absorción, y actualmente, es normalmente suficiente para obtener las fases de los *scatterers* anómalos, siempre que la proteína tenga un número suficiente de dichos *scatterers* con respecto al número de residuos que contiene la cadena polipeptídica. La estimación aproximada es de un átomo de selenio por cada 100 residuos de proteína. La técnica de resolución estructural seleccionada en nuestro caso fue SAD. El número de seleniometioninas en la cadena polipeptídica del constructo es 4 y el número de aminoácidos, 186.

El análisis de los datos de difracción de datos mediante el servidor online "Diffraction Anisotropy Server" de la universidad de California (UCLA) (<https://services.mbi.ucla.edu/anisoscale/>), evidenció una alta anisotropía en el espectro de difracción, que requirió una corrección de las intensidades acorde a sus características.

La simetría más probable del cristal fue analizada mediante el estudio de la función de autorotación (calculada con el programa MOLREP5 del paquete CCP4²⁵⁹), a partir de las reflexiones colectadas). El *plot* a $\text{Chi}=120^\circ$ indicó la presencia de un eje ternario paralelo al eje c. Por su parte, el *plot* a $\text{Chi}=180^\circ$ reveló la presencia de ejes binarios perpendiculares al eje c, y separados por una rotación de 60° entre sí con respecto a este eje, compatibles con un sistema cristalino trigonal, perteneciente a la clase de Laue $-3m$, (Fig. 4.10). El Volumen de Matthews (V_M)²⁶⁰ resultó compatible con la presencia de 9 o 12 moléculas en la unidad asimétrica con coeficientes de Matthews de 2.54 y $1.91 \text{ \AA}^{-3} \text{ Da}^{-1}$, y un contenido de solvente del 51 y 35% respectivamente. Teniendo en cuenta el limitado poder de difracción de los cristales, se estimó que nueve moléculas en la unidad asimétrica era la solución más probable. La obtención de fases iniciales mediante la localización de los átomos de selenio presentes en la selenio-metioninas, se realizó iterativamente considerando como posibles cualquiera de los grupos espaciales

Resultados

compatibles con la clase de Laue $-3m$: P₃₂₁, P₃₁₂, P_{3₁2₁}, P_{3₁1₂}, P_{3₂2₁} and P_{3₂1₂}. La solución con mejores estadísticas en el faseado y el mejor mapa de densidad electrónica, (los programas empleados fueron SHELX²⁴⁷ y AutoSol²⁴⁴ del paquete Phenix) se obtuvo en el grupo espacial P_{3₂2₁}, en el que se refinó el modelo final (con el programa Phenix.Refine)²⁴⁴. Los parámetros de celdilla se recogen en la tabla 4.2.

4.3.4. Estructura cristalina de CNNM4_{cNMP}.

La estructura cristalina del dominio cNMP de CNNM4 muestra plegamiento de tipo α/β , constituido por una región central, que comprende 7 láminas β , flanqueadas por α -hélices tanto en el extremo N (hélices α N1 y α A) como en el C-terminal (hélice α B) (Fig 4.11)

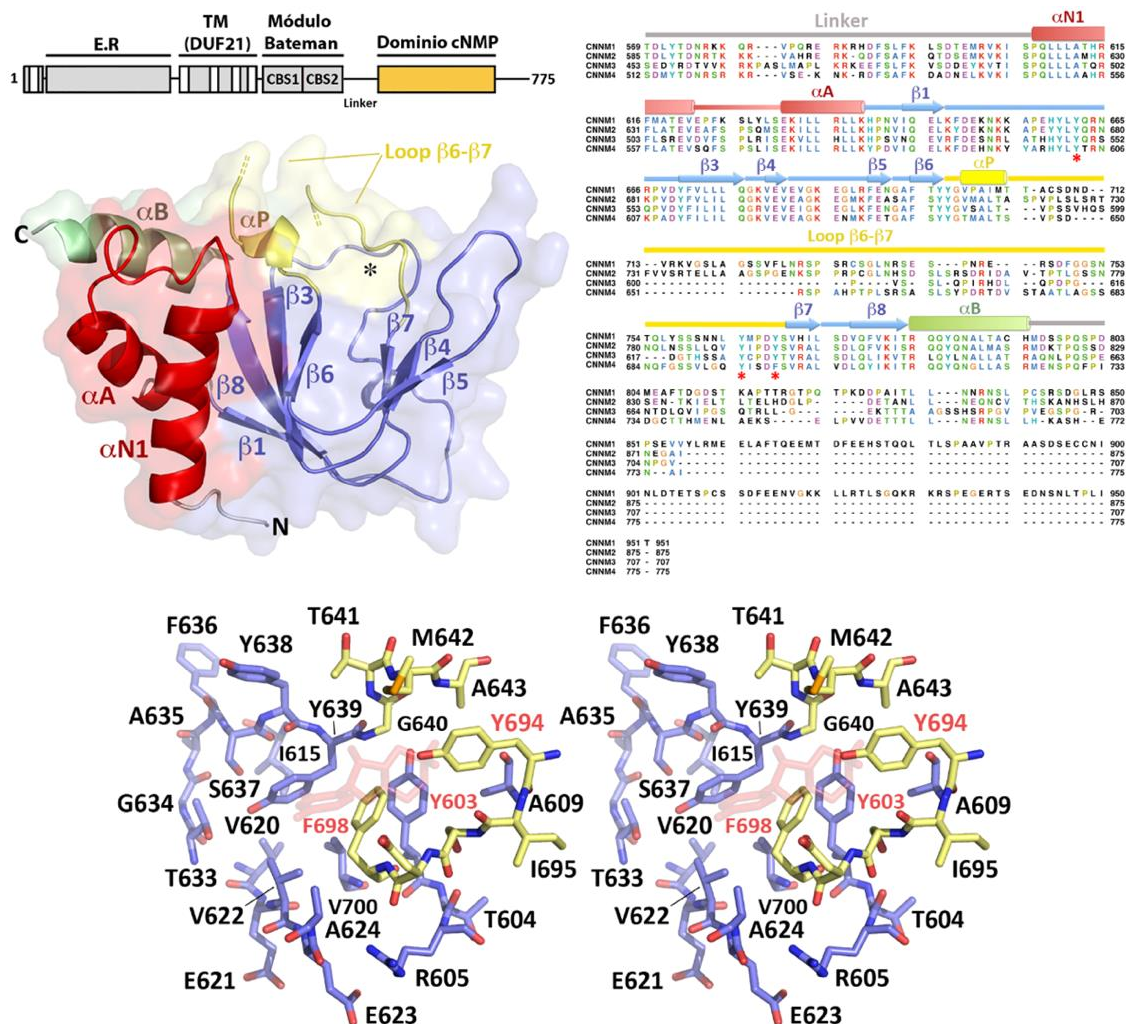


Figura 4.11. (Arriba, izquierda) El dominio cNMP está formado por dos hélices α en la región N-terminal, denominadas α N1 y α A (en rojo), seguidas de una región que se dispone centralmente y que recibe el nombre de β -roll, el cual está a su vez formado por 7 láminas β (en azul). En la región C-terminal la proteína presenta una hélice α denominada α B (en verde). El β -roll alberga una cavidad central (la base está resaltada con un asterisco) que contiene una región denominada “Phosphate Binding Casette” (PBC, en amarillo) que a su vez

Resultados

está formada por una pequeña vuelta de hélice (αP) y un bucle (*loop*) extendido de aproximadamente 40 residuos, invisible en el cristal y que une las láminas $\beta 6$ y $\beta 7$. (*Arriba, derecha*) Alineamiento de secuencia de los dominios cNMP de proteínas CNNM humanas. El "loop" que conecta las láminas $\beta 6$ y $\beta 7$ está presente en los cuatro miembros de la familia, aunque es más largo en CNNM1 y CNNM2, y más corto en CNNM3. La región que sigue a continuación de la hélice αB y que probablemente esté desestructurada, no se encuentra presente en el constructo a partir del cual resolvimos la estructura. (*Abajo*) estereo-par que muestra en detalle los residuos que ocupan la cavidad central del β -roll. Los residuos pertenecientes a las láminas β y a la región del PBC están representados en azul y amarillo respectivamente. En CNNM4, los residuos Y603, Y694 y F698 (resaltados en rojo e indicados con un asterisco en el alineamiento de secuencia) ocupan la posición que en otros CNBDs alojaría un nucleótido cíclico (una molécula de AMPc se encuentra superpuesta en rojo transparente en esa posición). El efecto estérico que ejercen estos residuos voluminosos explica la incapacidad de los CNNMs de unir (y estar regulados) por nucleótidos cíclicos.

La estructura cristalina de CNNM4_{cNMP} que hemos resuelto, confirma un plegamiento similar al de la familia de dominios de unión a nucleótidos cíclicos (CNBDs). Los CNBDs regulan la actividad de las proteínas en las que están presentes mediante la unión de un nucleótido cíclico como AMPc o GMPc. Algunos ejemplos de estas proteínas son la proteína quinasa A o G (PKA y PKG, respectivamente) o los canales de potasio activados por la unión de un nucleótido cíclico (CNGs por sus siglas en inglés "*Cyclic Nucleotide Gated channels*")^{6,9,257}. En ellas, la región central recibe el nombre de " β -roll" y normalmente incluye ocho láminas β que se sitúan en una disposición antiparalela, formando una cavidad interior en forma de bolsillo donde se aloja el nucleótido. La primera gran diferencia que muestra la estructura de CNNM4 se observa en esta región, que presenta en la zona correspondiente a la lámina $\beta 2$ un pequeño giro que impide la formación de dicha lámina β en CNNM4 (Fig. 4.11). El β -roll de CNNM4, por tanto, contiene 7 láminas β en lugar de 8. Para facilitar el estudio comparativo con otras proteínas estructuralmente equivalentes, hemos numerado las láminas β de CNNM4 saltando la lámina $\beta 2$ (figura 4.11).

De forma similar a proteínas que unen nucleótidos cíclicos, el β -roll de CNNM4 presenta una región denominada "*Phosphate Binding Casette*" (PBC), que contiene una pequeña hélice (αP) entre las láminas $\beta 6$ y $\beta 7$, que estabiliza el grupo fosfato del nucleótido unido en proteínas reguladas por dominios CNBDs. Sin embargo, en contraste con dichas proteínas, CNNM4 no posee los residuos que habitualmente estabilizan el grupo fosfato del nucleótido cíclico dentro de la cavidad. A continuación del PBC, CNNM4_{cNMP} contiene un bucle (*loop*) extendido de aproximadamente 47 residuos que conecta las láminas $\beta 6$ y $\beta 7$. La flexibilidad y movilidad de este *loop* impide verlo en nuestros cristales. La presencia de este largo bucle parece una característica única de la familia CNNM y de sus homólogos. En CNNM2, por ejemplo el *loop* es incluso más largo y está formado por 69 residuos (Fig. 4.11, Alineamiento). En otros dominios CNBDs, este segmento de la cadena es significativamente más corto (entre 5 y 10 aminoácidos) (Fig 4.11). La presencia de una región desordenada tan extensa, explica la pobre calidad de

difracción de nuestros cristales, y sugiere una posible modificación para mejorar la resolución de los cristales.

4.3.4.1. El dominio cNMP de CNNM4 no une nucleótidos cíclicos.

La cavidad central del β -roll de los CNBDs aporta el sitio de unión de nucleótidos cíclicos. Estos se alojan en su interior y establecen interacciones con residuos específicos que normalmente se encuentran conservados. Los más característicos son un glutamato o aspartato situado en la región del PBC, que estabiliza el 2'-OH de la ribosa del nucleótido (E292 en PKGI) y una arginina situada en la región que conecta las láminas β 6 y β 7, que estabiliza el grupo fosfato del nucleótido (R301 en PKGI) (Fig. 4.12). Estos dos residuos están sustituidos por Thr/Val y Ser/Pro en las proteínas CNNM humanas respectivamente. Además, dominios CNBDs encargados de unir nucleótidos cíclicos derivados de guanina (GMPc) presentan una arginina localizada en la lámina β 5, que estabiliza el -OH del anillo de guanina. En las proteínas CNNMs, esta arginina está sustituida por un residuo ácido (E632 en CNNM4). La figura 4.12 muestra un alineamiento de los dominios CNBDs de diferentes familias de proteínas reguladas por nucleótidos cíclicos como por ejemplo las proteínas quinasa A y G (PKA, PKG) (reguladas por la unión de AMPc y GMPc respectivamente) o los canales de potasio activados por hiperpolarización y un nucleótido cíclico (HCNs y CNGs respectivamente), que presentan las regiones conservadas mencionadas anteriormente.

Como se menciona en el apartado anterior, la región correspondiente a la lámina β 2 de los CNBDs canónicos, adopta un giro brusco en CNNM4 que impide la formación de esta lámina. Como consecuencia de este giro en la cadena principal, la cadena lateral del residuo Y603 se orienta hacia el interior de la cavidad del β -roll, donde potencialmente se situaría el nucleótido cíclico en otras proteínas. En CNNM4, la cavidad se encuentra ocupada por las cadenas laterales de otros dos residuos, Y694 y F698. La superposición de CNNM4_{cNMP} con un CNBD que aloje un nucleótido cíclico unido (por ejemplo el de la proteína correspondiente al código PDB 4Z07) demuestra que la cadena lateral de los tres residuos mencionados (Y603, Y694 y F698), colisionarían con un nucleótido alojado en el interior de la cavidad (Fig. 4.11. Estereopar).

Resultados

hPKG1-beta (4Z07)

CNNM4

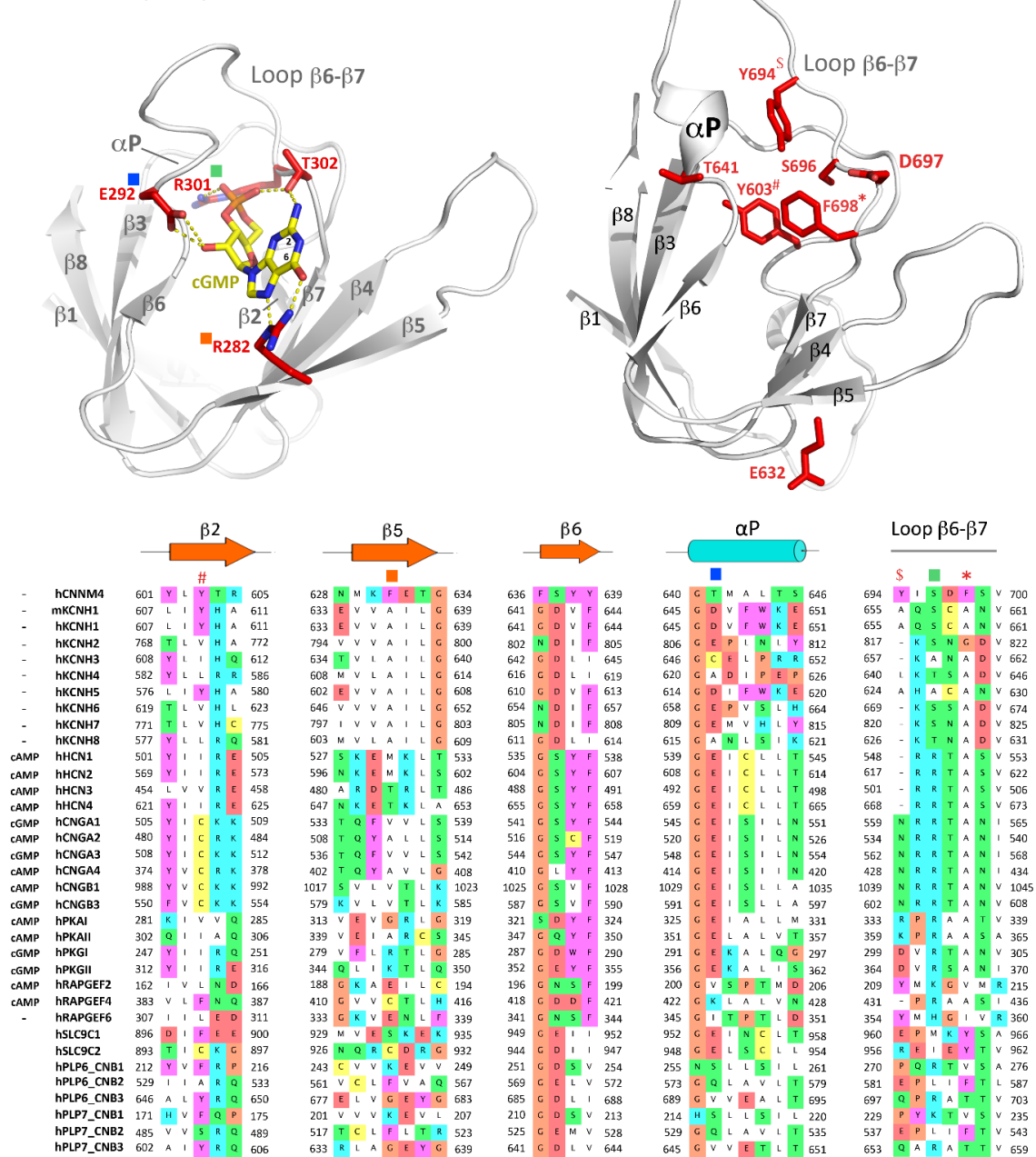


Figura. 4.12. CNNM4_{cNMP} carece de los residuos implicados en la unión a un nucleótido cíclico. (Arriba) Representación esquemática del β-roll del CNBD de la proteína PKGI (Código PDB 4Z07) y del dominio cNMP de CNNM4. Los residuos involucrados en la unión de GMPc (amarillo) se encuentran resaltados en rojo. El dominio cNMP de CNNM4 no contiene ni los residuos equivalentes ni el espacio suficiente para alojar un nucleótido cíclico, ya que la cavidad se encuentra ocupada por residuos voluminosos (Y603, Y694 y F698). Los residuos de CNNM4 T641, S696, D697 y E632 se encuentran localizados en la región equivalente de los residuos E292, R301, T302 y R282 de PKGI respectivamente. (Abajo) Alineamiento de secuencia de hCNNM4 vs CNBDs y CNCBHs (*cyclic nucleotide binding homology domains*) de otras proteínas humanas. Para facilitar la interpretación, la localización de los residuos claves en la interacción con un nucleótido cíclico y sus equivalentes en CNNM4 se ha resaltado con símbolos y cuadrados coloreados. Los nucleótidos cíclicos conocidos que interactúan con proteínas del alineamiento se indican a la izquierda. La carencia de unión se indica con (-). Los códigos de Uniprot de las proteínas presentes en el alineamiento son: hCNNM4, Q6P4Q7; MmKCNH1, Q60603; hKCNH1, O95259; hKCNH2, Q12809; hKCNH3, Q9ULD8; hKCNH4, Q9UQ05; hKCNH5, Q8NCM2; hKCNH6, Q9H252; hKCNH7, Q9NS40; hKCNH8, Q96L42; hHCN1, O60741; hHCN2, Q9UL51; hHCN3, Q9P1Z3; hHCN4, Q9Y3Q4; hCNGA1, P29973; hCNGA2, Q16280; hCNGA3, Q16281; hCNGA4, Q8IV77; hCNGB1, Q14028; hCNGB3, Q9NQW8; hPKAI, P10644; hPKAI1, P31323; hPKGI, Q13976; hPKGII, Q13237; hRAPGEF2, Q9Y4G8; hRAPGEF4, Q9EQZ6; hRAPGEF6, Q8TEU7; hSLC9C1, Q4G0N8; hSLC9C2, Q5TAH2; hPLP6, Q8IY17; hPLP7, Q6ZV29.

Resultados

El hecho de que las proteínas CNNMs carezcan de los residuos necesarios para estabilizar un nucleótido cíclico, junto a la presencia de tres residuos hidrofóbicos voluminosos (Y603, Y694 y F698) en el interior de la cavidad donde teóricamente se situaría el nucleótido, explica la incapacidad del dominio cNMP de las proteínas CNNMs para alojar y estar reguladas por este tipo de moléculas, y plantea nuevos interrogantes acerca de la función de este dominio. Esta incapacidad de unir nucleótidos cíclicos (por ejemplo cAMP y cGMP) inferida a partir de la estructura cristalina, fue confirmada mediante experimentos de ITC (por sus siglas en inglés Isothermal Titration Calorimetry) y RMN (Resonancia Magnética Nuclear) en colaboración con los laboratorios de Irene Díaz Moreno (Universidad de Sevilla) y Francisco J. Blanco (CIC bioGUNE). El estudio se extendió al constructo $\text{CNNM4}_{\text{BAT-cNMP-Ctail}}$, que además del módulo cNMP, contiene el módulo Bateman y la cola C terminal. Como se muestra en los termogramas, los calores de inyección, en titulaciones realizadas con AMPc y GMPc, sobre el constructo $\text{CNNM4}_{\text{BAT-cNMP-Ctail}}$ permanecieron constantes a lo largo de toda la titulación, indicando la ausencia de interacciones específicas entre proteína y nucleótido, al menos en las condiciones experimentales utilizadas (Fig. 4.13). Los análisis de resonancia magnética tampoco mostraron ningún cambio en el espectro tras la adición de AMPc y GMPc en $\text{CNNM4}_{\text{cNMP}}$ marcado con N^{15} .

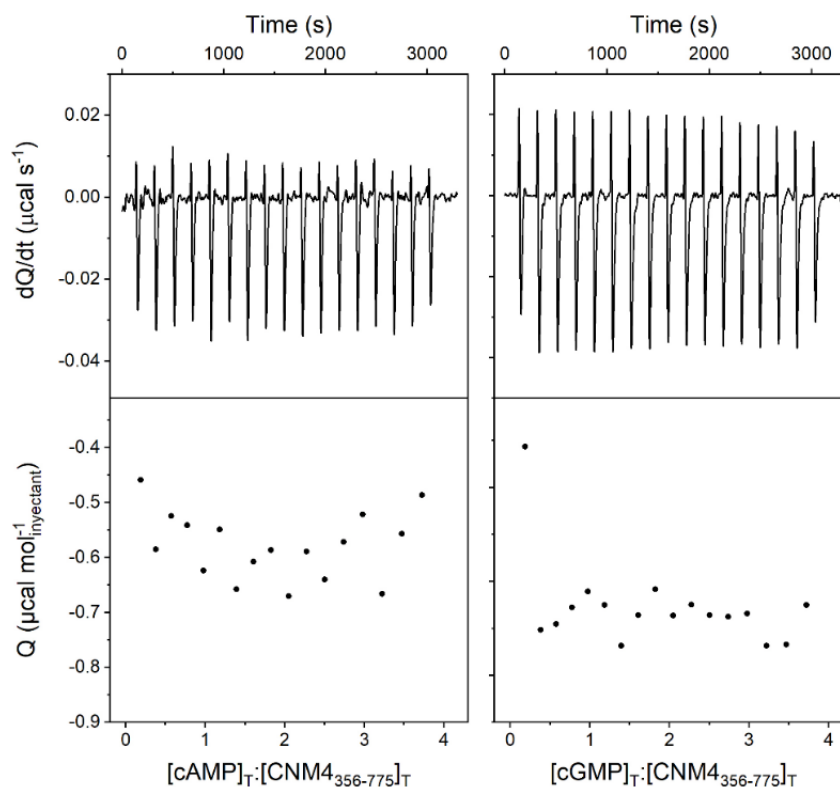


Figura 4.13. Valoración calorimétrica de la afinidad de $\text{CNNM4}_{\text{BAT-cNMP-Ctail}}$ por nucleótidos cíclicos. La figura muestra el experimento de ITC realizado con el constructo $\text{CNNM4}_{\text{BAT-cNMP-Ctail}}$ como analito. Los titulantes son AMPc a la izquierda y GMPc a la derecha.

Resultados

H2QID4; *Pa*_{CNNM4}, A0A096NGR9; *Cj*_{CNNM4}, F711N7; *Mm*_{CNNM4}, Q69ZF7; *Sj*_{CNNM4}, G3WZR3; *Ml*_{CNNM4}, G1QFN; *Am*_{CNNM4}, G1LFK1; *Bt*_{CNNM4}, F1MK24; *Ss*_{CNNM4}, F1STC6; *La*_{CNNM4}, G3TEW1; *Ee*_{CNNM4}, A0A1S3AIV6; *Cl*_{CNNM4}, F1PJ05; *As*_{CNNM4}, A0A1U7S4Z7; *Ip*_{CNNM4}, W5UIQ1; *Dr*_{CNNM4}, F1Q7I7; *Gg*_{CNNM4}, A0A1D5P3M6; *Cc*_{CNNM4}, A0A091H8N3; *Xt*_{CNNM4}, A0JPA0; *Oc*_{CNNM4}, A0A1D2NLL8; *Cs*_{CNNM4}, A0A2J7RPU8; *Ap*_{CNNM4}, A0A1W4XF17

4.3.4.2. El dominio cNMP de CNNM4 forma dímeros simétricos

El análisis del entorno molecular de cada subunidad CNNM4_{cNMP} en el cristal, sugirió la presencia de dímeros compactos, y no de entidades monoméricas. La asociación más compacta entre moléculas vecinas (analizada con el servidor PISA (<http://www.ccp4.ac.uk/pisa/>)) es la que se indica con la letra B en la Fig. 4.15 La superficie no accesible (en inglés *Buried Surface*) entre ambas subunidades es de 616,9 Å². Los dímeros que forman el cristal también fueron detectados en solución, mediante estudios paralelos de dispersión de luz multiangular (MALS) y de dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS).

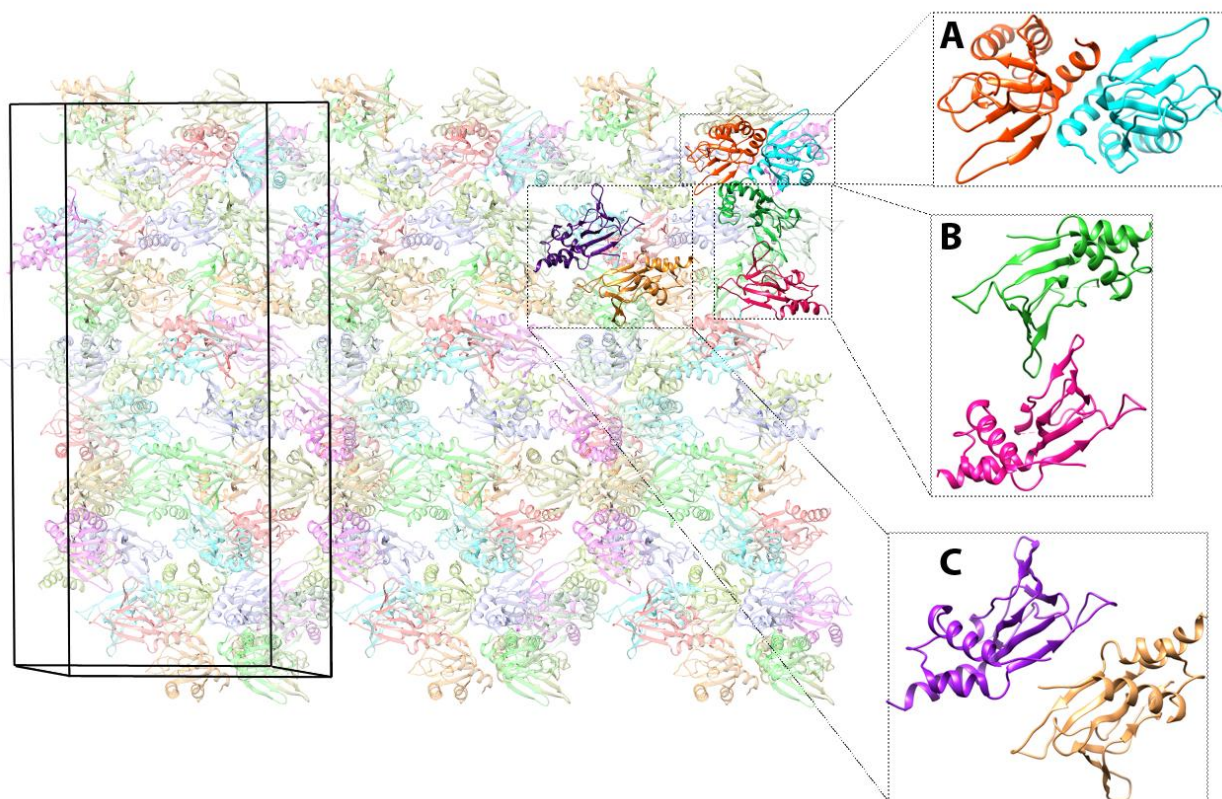


Figura. 4.15. El empaquetamiento cristalino de CNNM4_{cNMP} revela la presencia de dímeros en el cristal. A, B y C, muestran las tres posibles asociaciones díméricas encontradas en el empaquetamiento cristalino. La celdilla unidad se muestra en negro.

El análisis mediante SEC-MALS muestra que CNNM4_{cNMP} tiende a asociarse en dímeros a medida que aumenta la concentración. A una concentración de 1mg mL⁻¹, el peso molecular calculado a partir de los datos MALS es 24.7KDa correspondiente a un monómero (el Mw teórico de una subunidad = 20.9 KDa). A 10 mg mL⁻¹, el pico mayoritario

Resultados

aislado en la cromatografía de exclusión molecular (la columna utilizada fue una Superdex 200 10/300 Increase (GE HealthCare)) y analizado por MALS indica un peso molecular de 33.9 KDa (Fig. 4.16). Este valor, intermedio entre la masa molecular teórica de un monómero y la de un dímero ($M_w(\text{dímero})=41.8$ KDa), se interpretó como una coexistencia de especies diméricas y monoméricas en la disolución, cuya proporción varía en favor del dímero al aumentar la concentración.

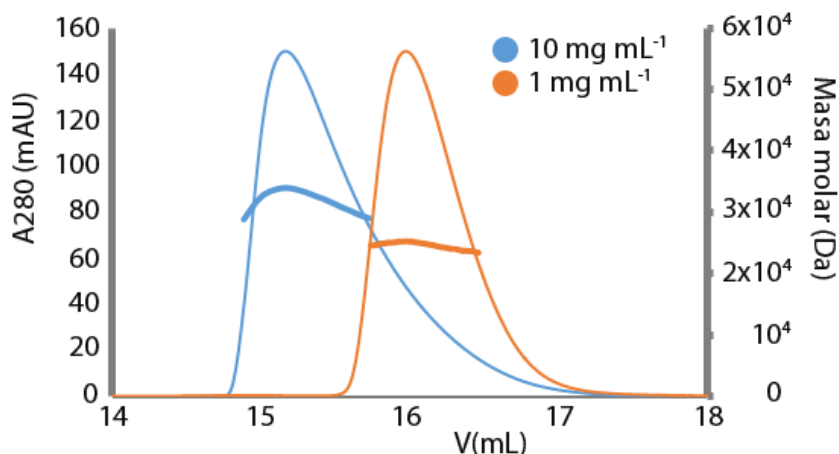


Figura. 4.16. SEC-MALS de CNNM4_{cNMP}. En azul se muestra el pico de elución y la masa molar (33.9KDa) a una concentración de 10mg mL⁻¹. En naranja a una concentración de 1mg mL⁻¹ (24.7KDa). El peso molecular del pico de 10 mg mL⁻¹ no es homogéneo debido a la mezcla de poblaciones de dímero y monómero.

4.3.4.3. Estructura en solución del dominio cNMP de CNNM4

Un estudio paralelo mediante la técnica SAXS permitió confirmar la presencia de dímeros en solución (Fig. 4.17). La concentración de proteína utilizada en los ensayos fue de 7mg mL⁻¹, valor similar al utilizado en los experimentos de cristalización. SAXS es una técnica biofísica que permite conocer la estructura de una macromolécula a baja resolución (15-30 Å). Adicionalmente proporciona información sobre la flexibilidad y el plegamiento de las proteínas²⁶⁴. En nuestro caso, el radio de giro (R_g) y la distancia máxima intramolecular (D_{max}) obtenidos fueron de 25 Å y 96 Å respectivamente. El volumen de Porod (V_p), (definido como $V_p = 2\pi^2 I(0)/Q$, donde $Q = \sqrt{s^2 [I(s) - K] ds}$ y K es una constante²⁶⁵) permite estimar el peso molecular de una proteína. Como regla general, se estima que el M_w de una proteína es igual a un valor de $0,53 \times V_p^{266}$. En el caso de CNNM4_{cNMP}, el valor obtenido de V_p es 102 (Tabla 4.3.), consistente con un dímero ($102 \times 0,53 = 54$ KDa; $M_{w\text{teórico}}(\text{Dímero}) = 42$ KDa). El exponente de Porod (parámetro experimental cuantitativo que da información sobre la compacidad de las partículas) es 2.3, consistente con una proteína flexible (Tabla 4.3.). De forma generalizada, se estima que un valor entre 2 y 3 es indicativo de proteínas flexibles, y que valores entre 3 y 4 es

Resultados

propio de proteínas compactas (<http://www.bioisis.net/>)²⁶⁴. El Kratky plot normalizado (*Dimensionless Kratky Plot*) evalúa cualitativamente la flexibilidad y/o el grado de desplegamiento de una biomolécula en solución²⁴⁹. El máximo obtenido en el *Dimensionless Kratky Plot* de CNNM4_{cNMP} se encuentra desplazado hacia arriba y a la derecha con respecto al máximo del pico obtenido para la proteína estándar BSA (Albúmina de Suero Bovina) (Fig. 4.17). Este perfil es característico de proteínas no globulares (elongadas), bien plegadas²⁴⁹.

Tabla 4.3. Parámetros de Colecta y procesado de SAXS

Parámetros de Colecta			
Línea de Sincrotrón	B21, Diamond Light Source, Harwell (UK)		
Detector	Pilatus 2M		
Tamaño del haz	0.2 x 0.2 mm		
Energía	12.4 keV		
Distancia al detector (mm)	4014		
q (\AA^{-1})	0.0038 - 0.42		
Tiempo de exposición (s)	3		
No de imágenes	620		
Temperatura (K)	293		
Método	SEC online		
Parámetros estructurales			
Construceto	CNNM4 _{cNMP}	CNNM4 _{BATcNMP-Ctail}	CNNM4 _{BATcNMP-Ctail + MgATP}
Código SASBDB	SASDER8	SASDEQ8	SASDES8
Concentración (mg mL ⁻¹)	7.0	5.0	4.7
q Interval for Fourier inversion (\AA^{-1})	0.014-0.2018	0.007-0.164	0.010-0.109
R_g [de P(r)] (\AA)	25.67 ± 1.32	41.62 ± 2.12	39.15 ± 1.38
R_g [aproximación de Guinier] (\AA)	25.52 ± 1.65	40.22 ± 0.54	39.23 ± 1.98
Límites sR_g [aproximación de Guinier]	0.34-1.30	0.31 – 1.30	0.41 – 1.30
Dmax (\AA)	96	166	143
Volumen de Porod (nm ³)	102	156	149
Exponente de Porod	2.3	3.2	3.3
Peso molecular (kDa)			
Del volumen de Porod (x0.53)	54	83	79
A partir de la secuencia	21	48	48
Software empleado			
Reducción de datos	DAWN pipeline (Diamond Light Source, UK)		
Procesamiento de los datos	ScÅtter v3.1v		
Modelado <i>Ab initio</i>	GASBOR		
Validación	DAMAVER/DAMCLUST		
Cálculo de intensidades del modelo	CRY SOL		

$q = 4\pi \sin(\theta/\lambda)$, donde 2θ es el ángulo de dispersión (scattering) y λ es la longitud de onda.

Resultados

De los datos experimentales obtuvimos una serie de modelos *ab initio* que se utilizaron para tratar de ajustar los tres posibles dímeros encontrados en el cristal. De los tres posibles dímeros, el que mejor valor de ajuste presentaba fue el representado en el panel B de la figura 4.15, con un $X^2=2.93$, (Fig. 4.17), que además se ajustaba muy bien con el volumen obtenido de SAXS.

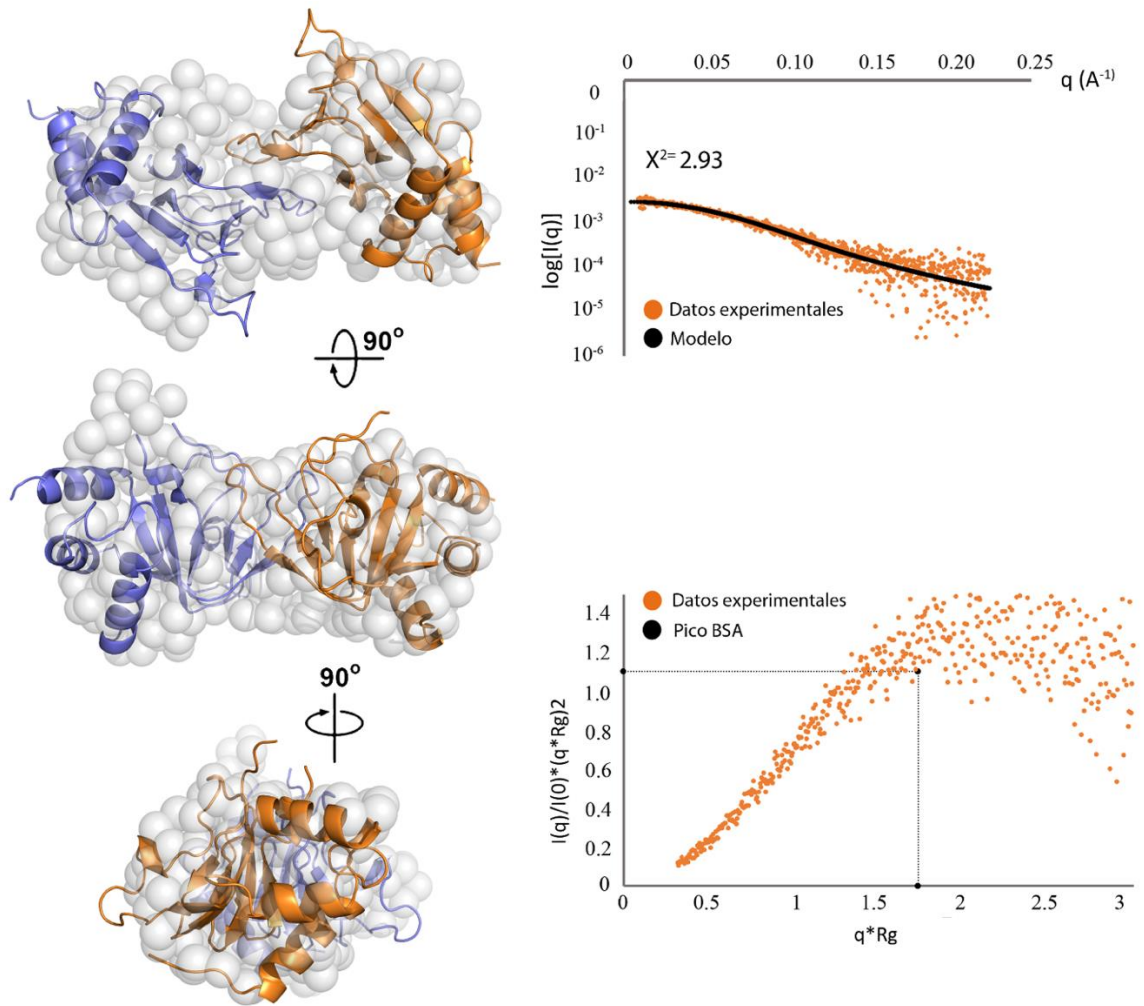


Figura 4.17. (Izquierda) El volumen obtenido mediante SAXS (esferas grises) era compatible con una molécula dimérica del dominio cNMP. El dímero de dominios cNMP (representado en azul y naranja), proporcionó un valor de ajuste (arriba, derecha) sobre los datos experimentales de $X^2=2.93$. (Abajo, derecha) El kratky-plot normalizado proporciona información sobre el plegamiento y flexibilidad que presenta una macromolécula. Los datos experimentales se muestran en naranja, y en negro se muestra el pico de la proteína BSA, utilizada como un estándar de proteína globular bien plegada. De los datos se extrae que el dominio cNMP es un dominio bien plegado no globular, y flexible en solución

4.3.4.4. El mutante F631A disgrega el dímero en monómeros.

El estudio SAXS confirmó la coexistencia de dímeros y monómeros de $\text{CNNM4}_{\text{cNMP}}$ en solución, y que la asociación entre subunidades se corresponde con la especie cristalizada e indicada en el panel **B** de la figura 4.15. Este dímero, presenta una interfaz

Resultados

entre subunidades mayoritariamente hidrofóbica que implica principalmente a los residuos E627, M629, F631, Y639, M642 y Y694. El residuo M629 (que se localiza en la región que precede a la lámina $\beta 5$) está orientado hacia la región hidrofóbica formada por la F631 (situada en la lámina $\beta 5$), la cadena alquílica del E627 (situado en la región que conecta las láminas $\beta 4$ y $\beta 5$) y los residuos V622, Y638 (lámina $\beta 4$) y Y639 (situado en la región que conecta la lámina $\beta 6$ y la hélice αP) de la subunidad complementaria. La red de puentes de hidrógeno entre los residuos E627, T633, G634, S637, Y639, Y694 y K626, junto al puente salino entre los residuos K626 y D697, contribuyen a estabilizar la interacción entre ambas subunidades (Fig. 4.18, panel A).

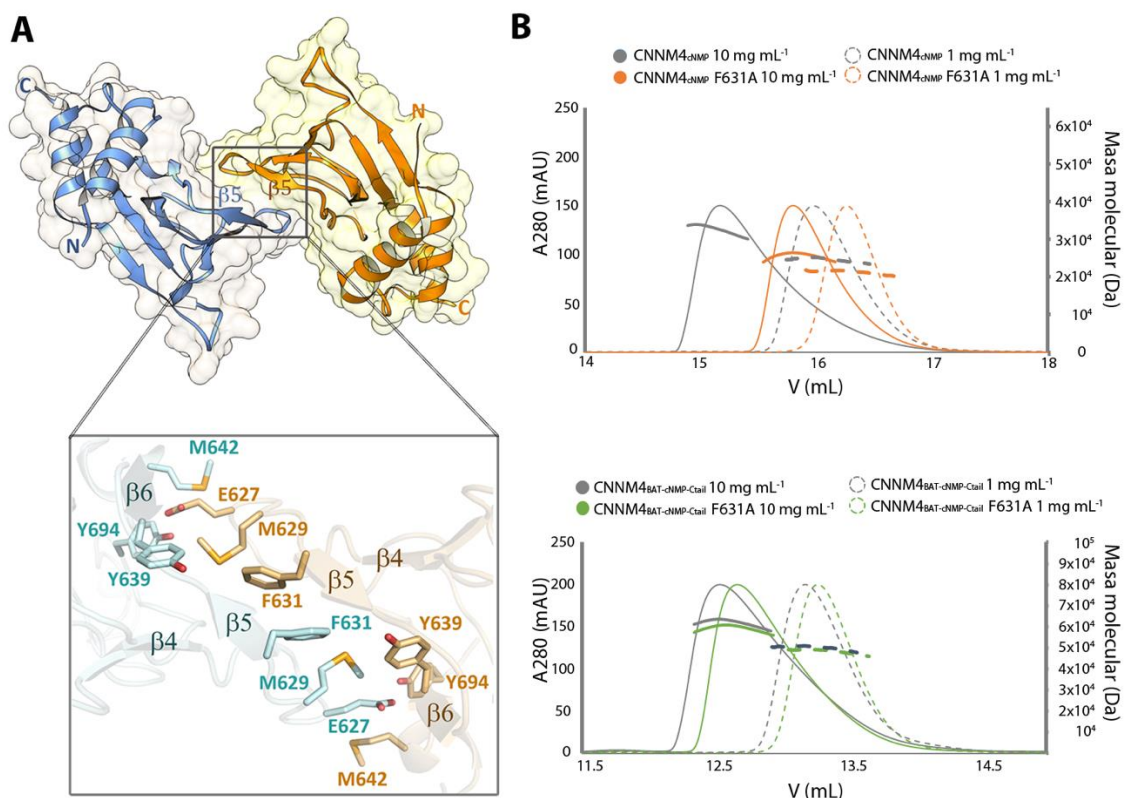


Figura 4.18. El cristal de CNNM4_{cNMP} contiene homodímeros. (A, arriba) La figura muestra el dímero cristalizado, también observado en los experimentos de SAXS. Las subunidades complementarias están representadas en azul y en naranja respectivamente. (Abajo) Detalle de los residuos localizados en la interfaz entre las dos subunidades complementarias (mayoritariamente hidrofóbicos). (B) La mutación F631A rompe el dímero (arriba), como se observa en el cromatograma de SEC-MALS. La proteína nativa, tiende a formar dímeros a medida que aumenta la concentración, siendo la proporción de monómero mayoritaria a 1 mg mL⁻¹ (gris punteado). A una concentración de 10 mg mL⁻¹, el mutante F631A (naranja) presenta una mayor proporción de monómero si se compara con CNNM4_{cNMP} nativo en las mismas condiciones (gris). El mutante F631A a una concentración de 1 mg mL⁻¹, es exclusivamente monomérico (naranja punteado), con un peso molecular en el centro del pico de 21.7 KDa (Mw de la proteína 21.26 KDa). Para averiguar si la dimerización es exclusivamente dependiente del dominio cNMP, o por el contrario también depende de la asociación de los módulos Bateman de subunidades complementarias, se examinó el efecto de la mutación F631A en el constructo CNNM4_{BAT-cNMP-Ctail}, que contiene la región intracelular completa de la proteína (abajo). El constructo CNNM4_{BAT-cNMP-Ctail} a una concentración de 10 mg mL⁻¹, aumenta la proporción de dímero respecto del mismo constructo a 1 mg mL⁻¹ (gris y gris punteado respectivamente). Sin embargo, el mutante F631A tiene un comportamiento similar a la proteína nativa tanto a 10 como a 1 mg mL⁻¹ (verde y verde punteado respectivamente). Estos resultados indican que el módulo Bateman también contribuye significativamente a la dimerización, y que su peso en la formación del dímero es probablemente mayor que el del dominio cNMP.

Resultados

Tabla 4.4. SEC-MALS. Mw en Da

Proteína	Mw (10 mg mL ⁻¹)	Mw (1 mg mL ⁻¹)	Mw teórico (Secuencia)
CNNM4 _{cNMP}	33920±50	24740±60	20936.78
CNNM4 _{cNMP} F631A	26440±50	21730±50	20860.68
CNNM4 _{BAT-cNMP-Ctail}	63610±100	51120±60	47861.17
CNNM4 _{BAT-cNMP-Ctail} F631A	60920±90	49230±80	47785.07

Con el objetivo de confirmar que los dímeros detectados en solución son los mismos que los observados en el cristal, mutamos el residuo F631 (localizado en la interfaz de subunidades complementarias) por una alanina en los constructos CNNM4_{cNMP} y CNNM4_{BAT-cNMP-Ctail} y analizamos posteriormente el efecto de dicha mutación por SEC-MALS. El análisis muestra que a 10mg mL⁻¹, la proporción de monómero en el constructo CNNM4_{cNMP} aumenta significativamente en el mutante, respecto de la proteína nativa con unos pesos moleculares experimentales de 26.4 y 33.9 KDa respectivamente (tabla 4.4) (Fig. 4.18, **B**), mientras que a una concentración de 1mg mL⁻¹, el peso molecular experimental de la proteína nativa es de 24.7KDa y del mutante son consistentes con un monómero en ambos casos (Tabla 4.4)

Por otro lado, el constructo CNNM4_{BAT-cNMP-Ctail} muestra un comportamiento similar en la proteína nativa y en el mutante, aumentando el ratio dímerno:monómero a medida que aumenta la concentración. El peso molecular a 10 y 1mg mL⁻¹ es de 63.6 y 51.2 KDa respectivamente (Mw teórico: 47.8). Los resultados obtenidos demuestran que la mutación F631A tiene un efecto dramático en el dominio cNMP aislado, pero no es tan eficiente en el desensamblaje del dímerno cuando están presentes el módulo Bateman y la cola C-tail. La masa molecular del mutante a concentraciones de 10 y 1 mg mL⁻¹, es 60.9 y 49.2 KDa, respectivamente (Mw teórico: 47.8). Los pesos moleculares obtenidos en el centro de los picos de elución SEC-MALS se muestran en la tabla 4.4. La conclusión de estos estudios es que la región intracelular de CNNM4 se autoensambla en solución gracias a la contribución de sus dos dominios, y no exclusivamente debido a la asociación del dominio cNMP.

4.4. ESTRUCTURA DE LA REGIÓN INTRACELULAR DE LAS PROTEÍNAS CNNM.

Una vez resueltas las estructuras cristalinas de los dos módulos intracelulares de CNNM4 de forma independiente, nos centramos en intentar conocer la orientación relativa de ambos dominios, bien en CNNM4 o en su homólogo más cercano, CNNM2. Los constructos diseñados para abordar este objetivo fueron los siguientes (Fig. 4.1.):

- (i) CNNM2₍₄₂₉₋₈₂₆₎; CNNM2₍₄₂₉₋₈₆₇₎; CNNM2₍₄₂₉₋₈₇₁₎; CNNM2₍₄₂₉₋₈₇₅₎;

Resultados

(ii) CNNM4₍₃₅₆₋₇₃₀₎; CNNM4₍₃₅₆₋₇₇₅₎.

Los constructos CNNM2₍₄₂₉₋₈₂₆₎ y CNNM4₍₃₅₆₋₇₃₀₎ comparten la característica de carecer de la cola desestructurada C-terminal. El protocolo utilizado de sobreexpresión y purificación de ambas proteínas permitía obtener muestras de alta pureza, pero nunca rindieron cristales. Desafortunadamente, la escasa reproducibilidad en el proceso de cristalización y el bajo poder de difracción de los pocos cristales obtenidos (resolución máxima de 11Å en el mejor de los casos), impidieron abordar su estudio cristalográfico.

En el caso de CNNM4₍₃₅₆₋₇₇₅₎ (que incluye la cola C), obtuvimos cristales en una única condición, que no pudo ser reproducida, sembrando la gota de cristalización²³⁶ con microcristales del dominio cNMP (CNNM4_{cNMP}).

4.4.1. Estructura en solución de la región intracelular de CNNM4

Ante la imposibilidad de obtener cristales de la región intracelular completa debido a la presencia de largos segmentos flexibles como el que conecta el módulo Bateman con el dominio cNMP y regiones desestructuradas (*loops*), en ambos dominios, decidimos estudiar estructuralmente esta región de la proteína mediante técnicas estructurales alternativas (aunque de menor resolución) como la crio-microscopía electrónica (estudio en progreso no incluido en esta memoria), y la dispersión de rayos X a bajo ángulo (*Small Angle X-rays Scattering*, SAXS). El estudio en solución SAXS fue realizado con el asesoramiento y colaboración del Prof. Dritan Siliqi, de la Universidad de Bari, Italia. Los constructos seleccionados fueron los de mayor tamaño CNNM2₍₄₂₉₋₈₇₅₎ y CNNM4₍₃₅₆₋₇₇₅₎, que en ambos casos contienen los dos dominios intracelulares (Bateman y cNMP), la hélice H0 N-terminal que conecta el módulo Bateman con la región transmembranosa, y la cola C que sigue al dominio cNMP. Los datos de mayor calidad, en los que nos centraremos en este apartado, se obtuvieron con la proteína CNNM4, y concretamente con el constructo CNNM4₍₃₅₆₋₇₇₅₎ (de ahora en adelante denominada CNNM4_{BAT-cNMP-Ctail}). La metodología utilizada viene detallada en el apartado 3.5 de materiales y métodos de esta memoria. Los valores de Rg y Dmax obtenidos fueron de 42Å y 166Å, respectivamente. El peso molecular estimado a partir del volumen de Porod (156 nm³) es el de un dímero de CNNM4_{BAT-cNMP-Ctail} (Tabla 4.3). El exponente de Porod (3.2), es representativo de una molécula que es más compacta que flexible²⁴⁹ (Tabla 4.3). El volumen *ab initio*, que presenta una forma alargada y pseudosimétrica (Fig. 4.20.), se utilizó para construir el modelo final de la región intracelular de CNNM4. Teniendo en cuenta la capacidad de autoasociarse tanto del módulo Bateman, como del dominio cNMP (derivada del estudio cristalográfico de ambos dominios por separado), decidimos realizar

Resultados

la construcción del modelo CNNM4_{BAT-cNMP-Ctail} admitiendo como posibles tres escenarios diferentes:

- (1) Escenario 1: permitimos que tanto CNNM4_{BAT} como CNNM4_{cNMP} se autoasociasen consigo mismos formando homodímeros (2xCNNM4_{BAT} y 2xCNNM4_{cNMP}). Posteriormente valoramos distintas orientaciones relativas de dichos homodímeros para refinar el modelo CNNM4_{BAT-cNMP-Ctail} final.
- (2) Escenario 2: sólo permitimos que CNNM4_{BAT} se asociase consigo mismo (formando un módulo CBS: 2xCNNM4_{BAT}), mientras que los módulos CNNM4_{cNMP} de subunidades complementarias se mantenían como entidades aisladas que no interaccionaban entre si.

En los escenarios 1 y 2, se contemplaron a su vez tres posibles conformaciones del módulo CBS: dos para los datos obtenidos en ausencia de MgATP ((i) y (ii)), y una para los datos obtenidos en presencia de MgATP (iii):

- (i) un módulo CBS “*Twisted*” como el descrito para CNNM2 en ausencia de ATP²⁰⁹;
- (ii) un módulo “*Semitwisted*” como el observado en nuestros cristales de CNNM4_{BAT} en ausencia de ATP;
- (iii) un módulo “*flat*” como el que adopta CNNM2 al unir ATP²⁰⁹.

(3) Escenario 3: admitimos combinaciones en las que el dominio CNNM4_{cNMP} se autoasocia formando dímeros 2xCNNM4_{cNMP} (como los observados en los cristales), y en el que las subunidades CNNM4_{BAT} complementarias permanecen separadas.

Las coordenadas atómicas utilizadas para valorar la potencial presencia de una conformación “*twisted*” en los datos SAXS de CNNM4 obtenidos en ausencia de ATP, corresponden a la estructura de CNNM2 depositada en la PDB con el código 4IYS (CNNM2 y CNNM4 sólo difieren en 4 residuos en el módulo Bateman). Las coordenadas del dominio cNMP empleadas en la modelización corresponden a las de nuestra estructura cristalina de CNNM4_{cNMP} en su forma dimérica (código PDB 6G52).

El primer paso de modelización consistió en evaluar todas las posibles orientaciones relativas de los dominios intracelulares sin incluir la región o “*linker*” que une el módulo Bateman y el dominio cNMP y la cola C-terminal. La organización que mejor se ajustaba a las curvas experimentales de SAXS se correspondía con una molécula de simetría binaria que se ajustaba al escenario (1) en el que, tanto el módulo Bateman como el dominio cNMP se mantienen como entidades dimericas. Una vez determinada la orientación relativa entre los dominios rotamos el dominio cNMP alrededor del eje de simetría binaria entre los módulos Bateman (Fig. 4.19) hasta que obtuvimos el mejor

Resultados

ajuste entre los datos experimentales y el modelo teórico teniendo en cuenta además la complementariedad morfológica entre los dominios intracelulares (Fig. 4.19; 4.20.).

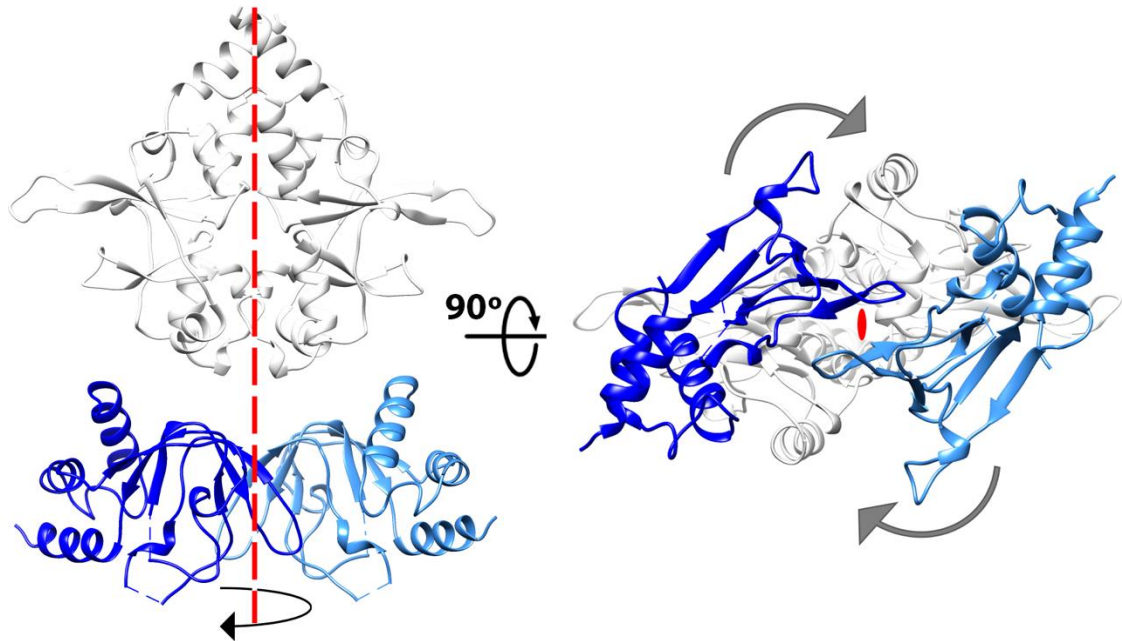


Figura 4.19. Con el objetivo de encontrar el modelo que mejor se ajustaba a los datos de SAXS, una vez determinada la orientación relativa entre el módulo Bateman (blanco) y el dominio cNMP (azul), el dímero de este último (una molécula se representa en azul claro y otra en azul oscuro) se rotó (flechas grises) alrededor del eje binario (línea roja) que atraviesa la molécula.

El modelo final se correspondía con una molécula con simetría binaria que se ajusta al escenario 1, donde los motivos CBS1 del módulo Bateman se sitúan en la cavidad formada entre los dominios cNMP que forman el dímero (Fig 4.20). Finalmente ajustamos la distancia entre los dos dominios a lo largo del eje binario hasta encontrar el modelo que mejor se ajustaba a la curva. La cadena polipeptídica que une los dos dominios intracelulares ("*linker*") y la cola-C fueron añadidas posteriormente mediante el programa CORAL²⁵⁴ (estas regiones se encuentran presentes en el constructo utilizado en el experimento SAXS, de tal manera que contribuyen a la dispersión por los rayos X y por tanto a la curva experimental de SAXS). El ajuste entre el modelo final y el la curva experimental fue de $X^2= 1.21$ (Fig 4.20)..

Resultados

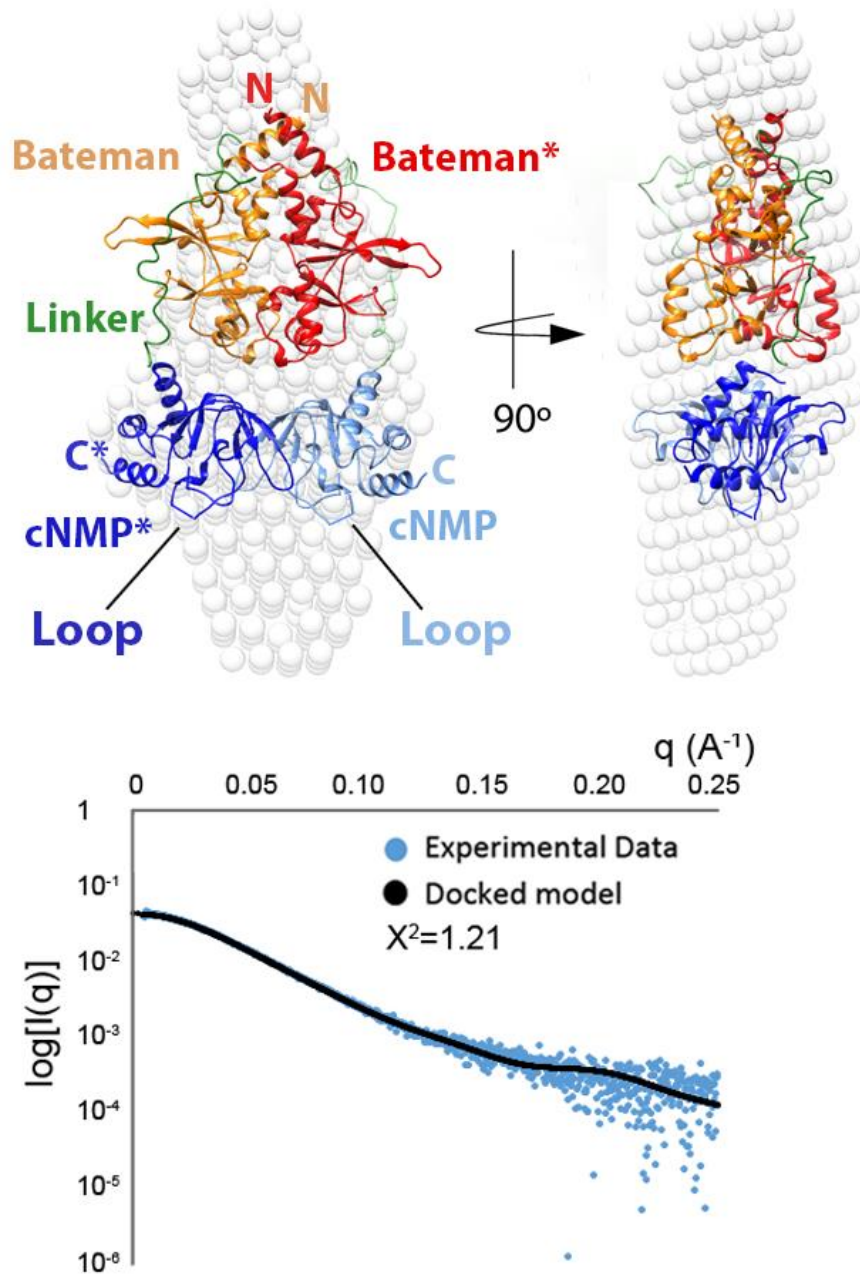


Figura.4.20. (Arriba). El volumen *ab initio* obtenido de los datos de SAXS se muestra en esferas gris claro. En su interior se muestra el modelo estructural de la región intracelular que mejor se ajusta a la curva SAXS. En rojo y naranja respectivamente, se representa el módulo CBS en conformación “*twisted*” (Código PDB 4IYS). En azul claro y oscuro se muestra el dímero del dominio cNMP (Código PDB 6G52). Las regiones de conexión entre el módulo Bateman y el dominio cNMP (“*linker*”) están representadas en color verde. (Abajo) el valor de ajuste entre la curva experimental de SAXS (azul) y la curva teórica del modelo (negro) fue $X^2=1.21$, La Cola-C no se representa, pero ha sido tenida en cuenta mediante el programa CORAL a la hora de calcular la curva.

Por otro lado, teniendo en cuenta la capacidad de $CNNM4_{BAT}$ de interactuar con MgATP, realizamos un estudio de SAXS de la región intracelular de CNNM4 en presencia de MgATP, con el objetivo de comprobar si la unión de MgATP afecta a la disposición relativa de los dominios intracelulares de CNNM4. En este experimento, el R_g y la D_{max}

Resultados

fueron de 39Å y 143Å respectivamente. El peso molecular estimado a partir del volumen de Porod se correspondía aproximadamente con un dímero de CNNM4_{BAT-cNMP-Ctail}. Los parámetros estructurales de SAXS se muestran en la tabla 4.3. El exponente de Porod (3.3) se correspondía con una proteína compacta. El volumen *ab initio* obtenido, era también muy similar al de CNNM4_{BAT-cNMP-Ctail} en ausencia de MgATP, de forma alargada y con pseudosimetría binaria. Con el objetivo de construir el modelo final de CNNM4_{BAT-cNMP-Ctail} en presencia de MgATP, realizamos de nuevo un estudio de los tres escenarios posibles planteados en la estructura de SAXS sin MgATP:

- (1) Escenario 1: Tanto CNNM4_{BAT} como CNNM4_{cNMP} se asocian consigo mismos formando homodímeros (2xCNNM4_{BAT} y 2xCNNM4_{cNMP}). Posteriormente también valoramos distintas orientaciones relativas de dichos homodímeros con el objetivo de refinar el modelo CNNM4_{BAT-cNMP-Ctail} en presencia de MgATP final.
- (2) Escenario 2: Tan solo CNNM4_{BAT} se asocia consigo mismo (formando un módulo CBS: 2xCNNM4_{BAT}), mientras que los módulos CNNM4_{cNMP} de subunidades complementarias se mantienen como entidades independientes que no interactúan entre sí.
- (3) Escenario 3: El dominio CNNM4_{cNMP} se asocia consigo mismo formando dímeros 2xCNNM4_{cNMP} (como los observados en los cristales), y las subunidades CNNM4_{BAT} complementarias permanecen separadas.

Sin embargo, sabiendo que CNNM2_{BAT} tras la unión de MgATP sufre un cambio conformacional que hace que el módulo CBS tenga una conformación plana o “Flat”, y habiendo demostrado que CNNM4_{BAT} también une MgATP y que la cavidad S2 es prácticamente idéntica a la de CNNM2, utilizamos las coordenadas de CNNM2_{BAT} con MgATP (Conformación “Flat”) para reconstruir el modelo en el volumen obtenido (Código PDB 4P1O).

De los tres escenarios, el modelo que mejor se ajustaba a los datos mantenía la misma orientación relativa entre el módulo Bateman y el dominio cNMP que en el SAXS en ausencia de MgATP (Fig.4.21.). En el modelo, el módulo CBS, en su conformación plana o “flat” se une, mediante los “linkers” a un dímero del dominio cNMP, situado en la parte inferior. La distancia relativa entre ambos dominios se mantuvo respecto del modelo en ausencia de MgATP. Las conexiones entre el módulo Bateman y el dominio cNMP, así como la región C-terminal fueron nuevamente añadidas con el programa CORAL²⁵⁴. El valor de ajuste entre los datos experimentales y el modelo fue de $X^2 = 1.17$ (Fig.4.21.).

Resultados

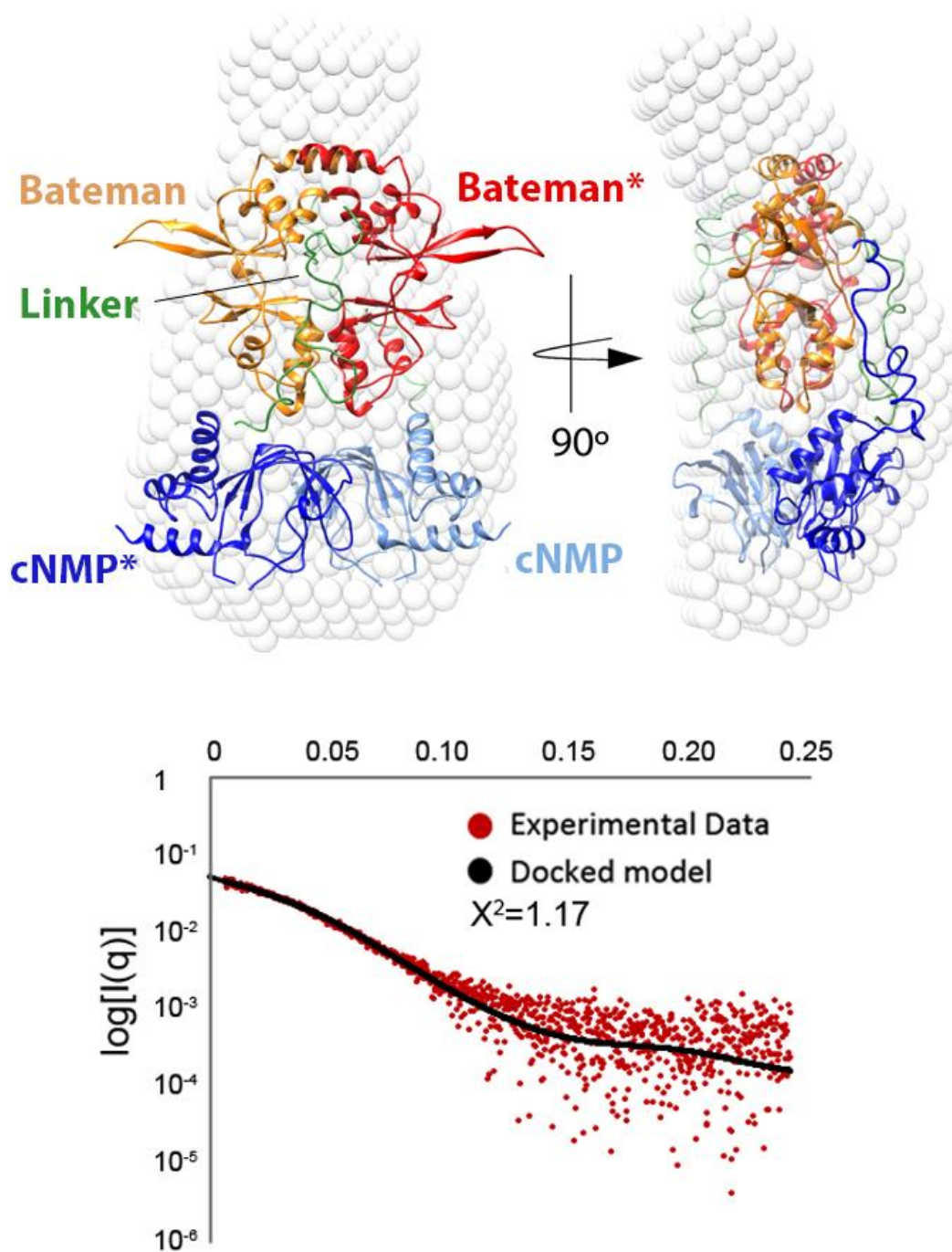


Figura 4.21. Modelo de SAXS de CNNM4_{BAT}-cNMP-Ctail en presencia de MgATP. (Arriba). El volumen *ab initio* obtenido se muestra en esferas gris claro. En el modelo construido, el módulo CBS y el dímero del dominio cNMP se sitúan manteniendo un eje de simetría binario a lo largo del eje y. El modelo se construyó utilizando las estructuras cristalográficas de CNNM2_{BAT} con MgATP (naranja y rojo) y del dominio cNMP (azul claro y oscuro) de CNNM4 (Códigos PDB 4P1O y 6G529). (Abajo) el valor de ajuste entre los datos experimentales de SAXS (rojo) y los datos teóricos del modelo (negro) fue de $\chi^2=1.17$.

4.4.2. Función estructural del dominio cNMP de CNNM4

Los modelos obtenidos de SAXS sugieren que el dímero del dominio cNMP define los límites morfológicos del cambio conformacional sufrido por el módulo Bateman tras la unión de MgATP (Cambio conformacional “*Twisted-to-Flat*”). En esta hipótesis planteamos que el módulo CBS se inserta en la cavidad que existe entre las subunidades del dímero del dominio cNMP, y este último establece los límites de desplazamiento del módulo CBS durante el cambio conformacional. Esta hipótesis se basa en la complementariedad morfológica existente entre el módulo CBS y el dímero cNMP tanto en la conformación “*Twisted*” como en la “*Flat*” (Fig. 4.22)

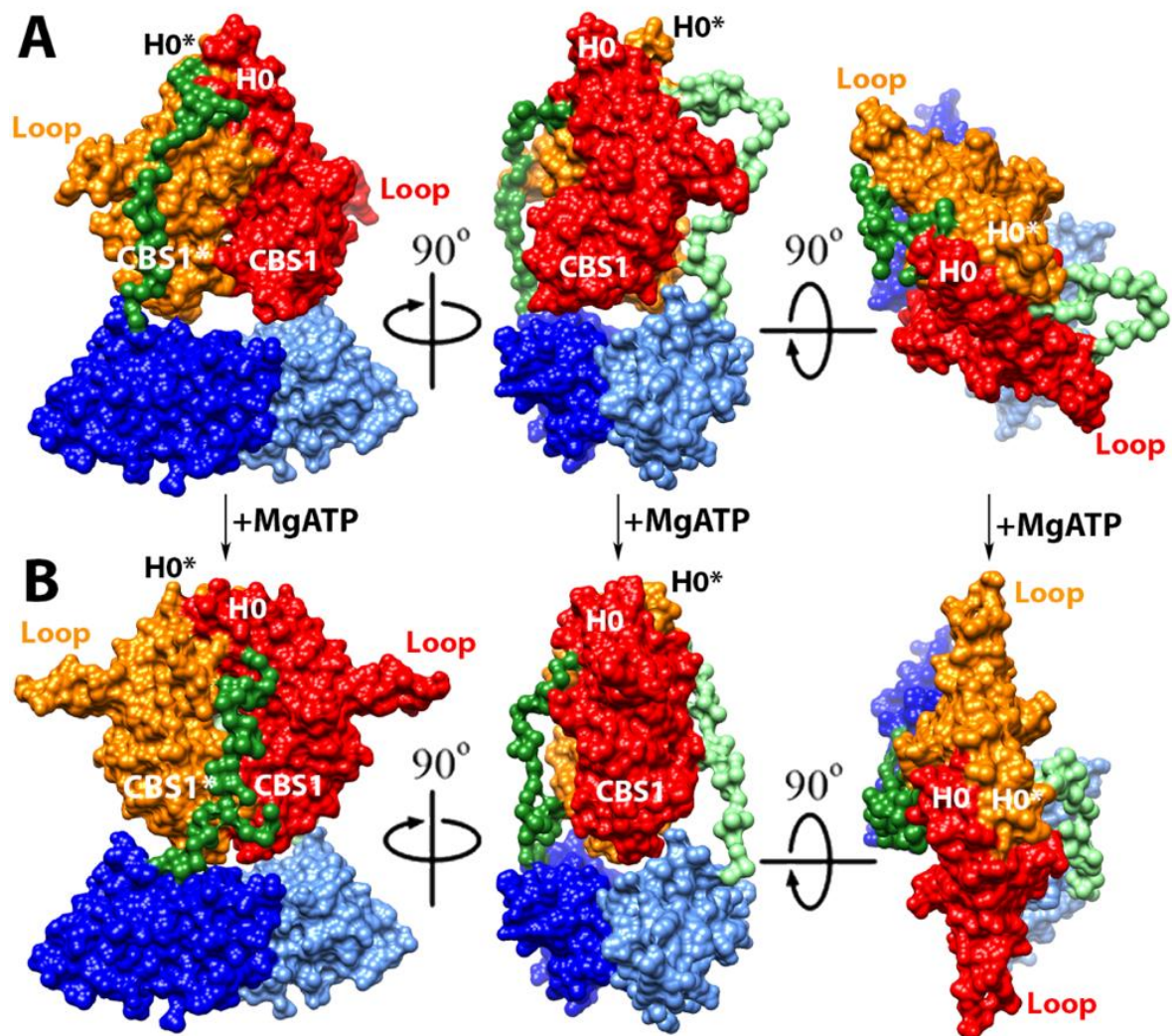


Figura 4.22. Estructura de región intracelular completa. La figura muestra tres vistas ortogonales en ausencia (A) y en presencia (B) de MgATP de la región intracelular de CNNM4. El módulo CBS, formado por dos módulos Bateman (rojo y naranja respectivamente), se encuentra sobre el dímero del dominio cNMP (azul oscuro y claro) con el que se conecta a través de las regiones de conexión (verde oscuro y claro). El motivo CBS1 de cada módulo Bateman se sitúa en la cavidad central formada en el dímero del dominio cNMP. Esta cavidad es morfológicamente complementaria a los dos motivos CBS1 del módulo CBS y restringe el movimiento en el cambio conformacional desde la conformación “*twisted*” (en A) a la conformación “*flat*” (en B) tras la unión de MgATP (en el sitio S2 entre los motivos CBS1 y CBS2). Las hélice H0 conectan el módulo Bateman con el dominio transmembrana DUF21

Capítulo 2.

Bases estructurales de la interacción oncogénica de los CNMNs con las fosfatasas de la familia PRL.

4.5. CNNM2_{BAT} INTERACCIONA CON LAS PROTEÍNAS PRLS.

En el año 2014, dos grupos dirigidos por Michel L. Tremblay (McGill University, Montreal, Canada)¹⁵⁸, y Miki Hiroaki (Research Institut for Microbial Diseases, Osaka, Japón)¹⁶⁰ demostraron de manera independiente que las proteínas CNNM eran capaces de interactuar directamente con las fosfatasa de la familia PRL (“*Phosphatases of the Regenerating Liver*”), y que dicha interacción traía como consecuencia un incremento de la concentración intracelular de iones Mg²⁺ que favorecía el crecimiento y la migración de células tumorales. Concretamente se demostró que CNNM3 podía acomplejarse con PRL-2 y CNNM4 con los tres miembros de la familia PRL (PRL-1, PRL-2 y PRL-3). Adicionalmente se postuló que la región más probable de interacción entre ambas proteínas correspondía a un “*loop*” largo, situado en el módulo Bateman de los CNNM, que conecta las láminas β5 y β6 del motivo CBS2.

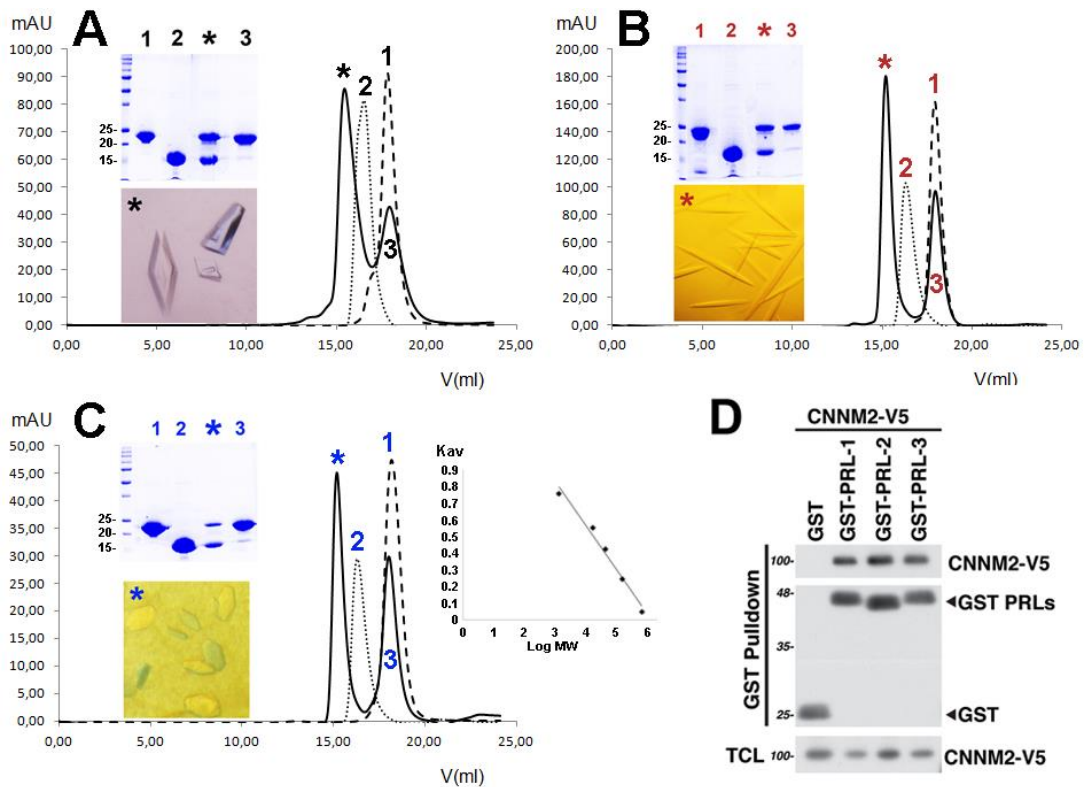


Figura.4.23. CNNM2_{BAT} interactúa con las tres PRLs. A-C muestran cromatografías de exclusión molecular donde se aisló el complejo CNNM2_{BAT} con PRL-1, -2, y -3 respectivamente. CNNM2_{BAT} y las PRLs puras se cargaron en la columna como controles (Picos 2 y 1 respectivamente). El pico 3 se corresponde con el exceso de PRL añadido al formar el complejo. Los complejos eluyeron en el pico marcado con un asterisco (*). La presencia de complejo en el pico * se confirmó mediante SDS-PAGE, donde el análisis de densitometría de bandas del complejo mediante la herramienta informática ImageJ (rsb.info.nih.gov) mostró una relación de 1.03, 0.97 y 0.95, es decir, una relación aproximada 1:1 entre CNNM2_{BAT} y la PRL. Los cristales obtenidos de cada complejo se muestran en su gráfico correspondiente, D muestra el experimento de *pull-down* donde GST-PRLs y V5_CNNM2 previamente transfectadas en células HeLa, se hicieron pasar por una resina de GST, de tal manera que se demostró la interacción entre CNNM2 y los tres miembros de la familia PRL utilizando anticuerpos para GST y V5. TCL se refiere al lisado celular total (Por sus siglas en inglés *Total Cell Lysate*)

Resultados

En base a estos datos preliminares, y en colaboración con el grupo de Tremblay, demostramos que CNNM2 posee idénticas capacidades de interacción con las PRL, mediante experimentos de “*pull-down*”, co-transfectando el constructo CNNM2 (*Full length*) fusionada con V5 y PRL-1, -2, -3 a su vez fusionadas con GST en células HeLa. Se realizó un experimento de “*pull-down*” utilizando resina de GST, que puso de manifiesto que CNNM2 interacciona con las tres PRLs (Fig. 4.23. **D**). Complementariamente, también demostramos la formación de los tres complejos mediante la incubación de las proteínas correspondientes y el aislamiento cromatográfico de dichos complejos (Fig. 4.23, **A, B y C**). Una vez probada la formación de los complejos, abordamos su estudio cristalográfico. El protocolo de formación de los complejos correspondientes se detalla en la sección de Materiales y métodos, 3.1.4.(Fig.4.23).

4.6. COMPLEJO CNNM2_{BAT}·PRL-1.

Los tres complejos formados por CNNM2_{BAT} con PRL-1,-2, y -3, fueron aislados, concentrados y utilizados en ensayos de cristalización. En los tres casos obtuvimos cristales, aunque los que mejor calidad de difracción presentaron fueron los del complejo CNNM2_{BAT}·PRL-1 (Fig. 4.23.)

4.6.1. Cristalización del complejo CNNM2_{BAT}·PRL-1.

Los cristales del complejo CNNM2_{BAT}·PRL-1 se obtuvieron a una concentración de 15 mg mL⁻¹ en 0.1M Acetato de sodio, pH 4,6 y 2M Formiato de Sodio, mediante el método de difusión de vapor en gota colgante, mezclando 1μL de complejo puro con 1μL de la solución de precipitación. (Sección 3.3. Materiales y Métodos). El mejor conjunto de datos se recogió en la línea XALOC del sincrotrón ALBA (Barcelona, España) y presentaba una resolución máxima de 2.4 Å. La función de autorotación (plot a Chi=180) indicó la presencia de tres ejes de rotación binarios, uno paralelo y dos perpendiculares al eje C y ortogonales entre si, consistentes con la clase de Laue mmm (Fig.4.24.). El Volumen de Matthews (V_M)²⁶⁰ resultó compatible con la presencia de 1 o 2 moléculas en la unidad asimétrica con coeficientes de Matthews de 3.79 y 1.89 Å³ Da⁻¹ respectivamente, y un potencial contenido de solvente del 67 y el 35% en cada caso. Los parámetros cristalográficos se recogen en la tabla 4.5. La estructura cristalina del complejo de CNNM2_{BAT}·PRL-1 se resolvió mediante la técnica de reemplazamiento molecular utilizando como modelo de búsqueda las estructuras de PRL-1 y CNNM2_{BAT} disponibles con anterioridad en la PDB (códigos PDB 4IY0 y 1XM2 respectivamente). El modelo final se refinó en el grupo espacial I222 a una resolución de 2.4Å. La unidad asimétrica contiene un heterodímero formado por una subunidad CNNM2_{BAT} y una molécula PRL-1.

Resultados

La unidad funcional presente en los cristales está constituida por un heterotetrámero simétrico 2xCNNM2_{BAT}+2xPRL-1(Fig.4.25)

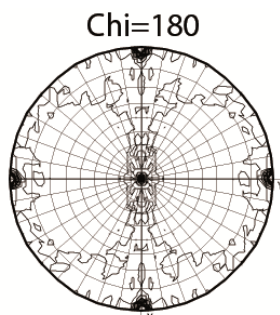


Figura 4.24. Función de autorotación calculada a partir de los datos de difracción de los cristales del complejo CNNM2_{BAT}-PRL-1. En Chi=180 se observan tres ejes de rotación de orden 2, ortogonales entre sí y paralelos a los ejes x, y y z.

Tabla 4.5. Estadísticas y refinamiento

Proteínas	CNNM2 _{BAT} + PRL-1	CNNM2 _{BAT} + PRL-1 +ATP+Zn ²⁺
Datos de colecta y procesamiento		
Línea de sincrotrón	ALBA, XALOC	ESRF ID23.1
Longitud de onda (Å)	0.9795	1.2837
Grupo espacial/ Código PDB	I222/5MMZ	C2/5LXQ
a (Å)	52.7	166.9
b (Å)	128.5	125.6
c (Å)	153.9	61.0
Moléculas por u.a	1x (PRL-1 x CNNM2 _{BAT}) (1 heterodímero)	2x (PRL-1 CNNM2 _{BAT}) (1 heterotetrámero)
Resolución (Å)	98.6 – 2.4 (2.41–2.40)	47.9–3.3 (3.34–3.33)
R _{sym} ^a	0.054 (1.151)	0.091 (1.120)
R _{meas} ^b	0.056 (1.197)	0.099 (1.221)
R _{pim} ^c	0.016 (0.327)	0.038 (0.478)
No. de reflexiones	271410	119978
No. de reflexiones únicas	20944	17,868
I/σ	26.5 (2.5)	13.9 (1.7)
CC1/2	0.99 (0.86)	0.99 (0.63)
Completitud (%)	99.8 (86.0)	99.9 (97.9)
Redundancia	13.0 (13.4)	6.7 (6.3)
Mosaicidad (°)	0.2	0.2
Estadísticas de refinamiento		
R _{work} ^d / R _{free} ^e	0.23/0.25	0.20/0.23
No. de átomos		
Proteína	2299	4648
Ligandos	-	62 (2 x ATP)/2 (Zn)
Moléculas de agua	7	-
Media de los factores B (Å ²)		
Proteína	78.4	70.7
Ligando	-	47.5 (ATP)/81.8 (Zn)
Moléculas de agua	73.9	-
Desviación cuadrática media		
Longitud de enlaces (Å)/Ángulos de enlaces (°)	0.003/0.804	0.001/1.255
Estadísticas de Ramachandran (%)		
Residuos en regions favorables	97.6	97.3
Residuos en regiones permitidas adicionales	2.4	2.7
Residuos en regions no permitidas	0	0

Cada set de datos se corresponde con un único cristal. La concha de mayor resolución se muestra entre paréntesis. $R_{sym}^a = \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$; $R_{meas}^b = \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$; $R_{pim}^c = R_{pim} = \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$. $R_{work}^d = \sum |F_o - F_c| / \sum F_o$. $R_{free}^e = \sum |F_o - F_c| / \sum F_o$, calculado utilizando un 5% de reflexiones aleatorias que no se incluyeron en el refinamiento.

4.6.2. Estructura cristalina del complejo CNNM2_{BAT}-PRL-1.

La estructura del complejo CNNM2_{BAT}-PRL-1, reveló un heterotetrámero de forma alargada, formado por un módulo CBS central (constituido por dos subunidades CNNM2_{BAT}), y dos moléculas PRL-1 independientes que no interaccionan entre sí y que se encuentran situadas a cada lado del disco (Fig. 4.25.) La interacción entre las subunidades de CNNM2_{BAT} ocurre a través de las hélices α interfaciales (H1, H2, H3 y H4) que encierra una superficie no accesible (en inglés *Buried Surface*) de 1416 Å². La superficie no accesible entre CNNM2_{BAT} y PRL-1, es de 491 Å².

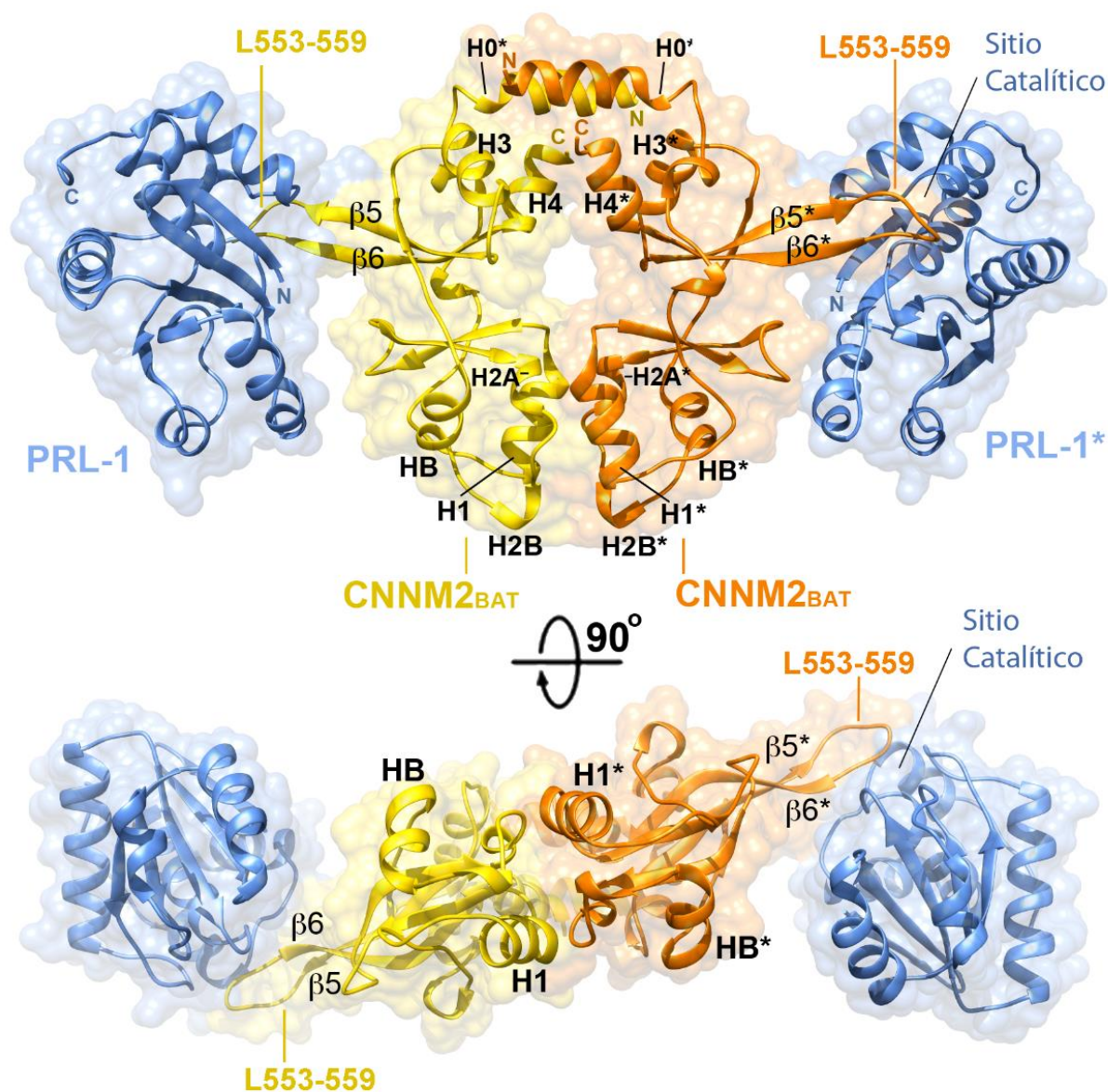


Figura. 4.25. Estructura del complejo CNNM2_{BAT}-PRL-1. La estructura cristalina reveló un heterotetrámero formado por un homodímero de CNNM2_{BAT} (en amarillo y naranja respectivamente) con dos moléculas de PRL-1 situadas a cada lado del disco (en azul). Los elementos de estructura secundaria de CNNM2_{BAT} se encuentran marcados en negro. A su vez las regiones que establecen contacto entre CNNM2_{BAT} y PRL-1 (la región L553-559 de CNNM2 y la cavidad catalítica de PRL-1) están resaltadas.

Resultados

La interacción entre CNNM2_{BAT} y PRL-1, conlleva una reorganización estructural en ambas proteínas. En CNNM2_{BAT}, la región que conecta las láminas $\beta 5$ y $\beta 6$ (el “loop” largo L553-559) (Fig. 4.26.) se ordena y se introduce en la cavidad catalítica de la proteína PRL-1. La disposición de forma alargada y expuesta de la región L553-559 sugiere que esta representa el primer punto de encuentro entre CNNM2 y PRL-1, cuando comienza la interacción. Concretamente, el residuo D558 se introduce en la cavidad catalítica de PRL-1 y ocupa la región del sustrato de la fosfatasa. La posición del residuo D558 se estabiliza mediante la formación de enlaces de hidrógeno con el -NH de la cadena alquílica de la arginina 110 y con el -NH₂ de la glutamina 145 de PRL-1 (Fig. 4.26.).

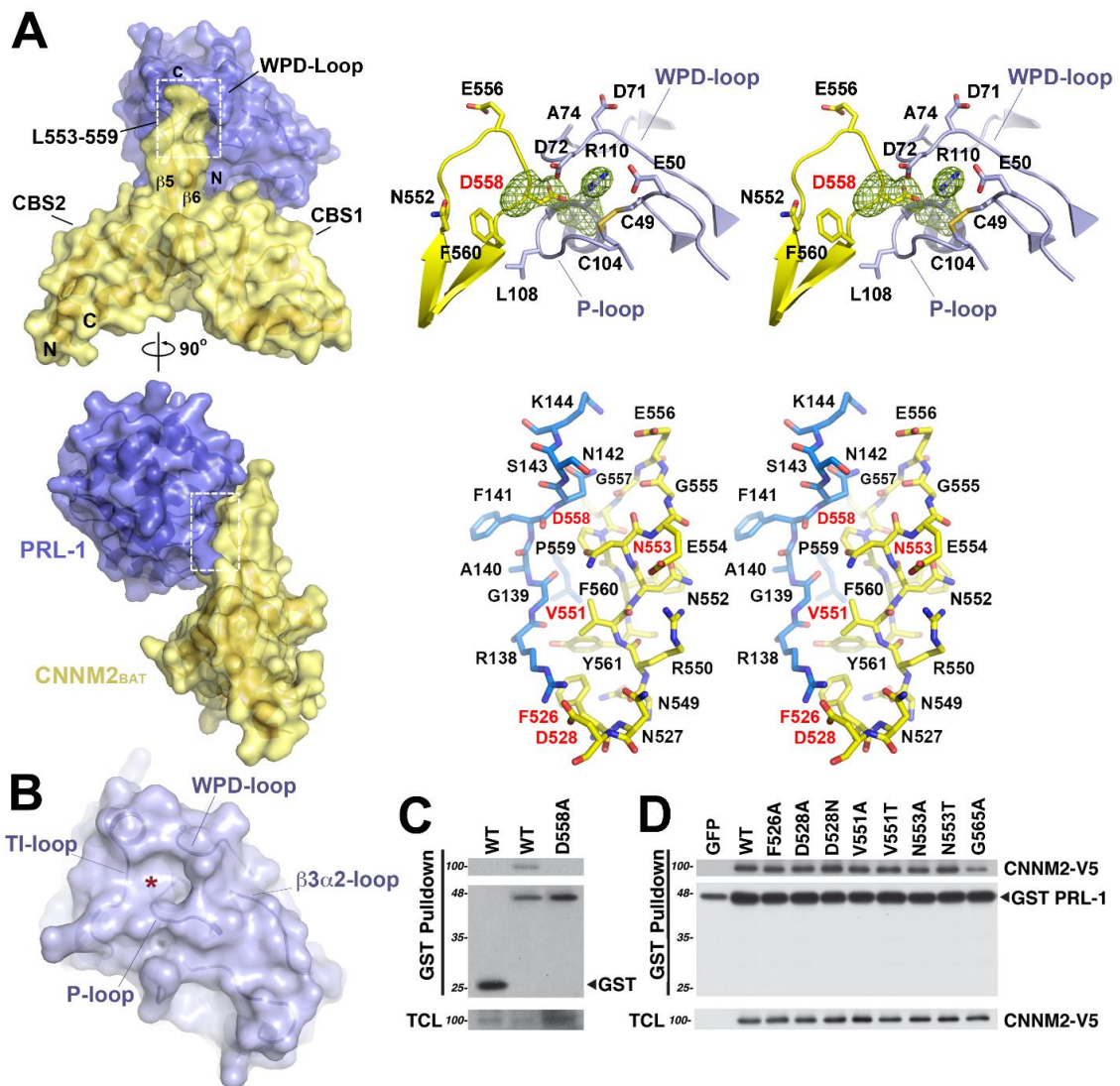


Figura. 4.26. (A, *Izquierda*) representación de la superficie del complejo formado por CNNM2_{BAT} (amarillo) y PRL-1 (Azul). Los residuos principales implicados en la interacción entre proteínas (señalados con líneas blancas) se muestran en detalle a la derecha. (*Derecha*) El residuo D558 se introduce en la cavidad catalítica de PRL-1, y ocupa la localización de análogos de sustrato (ej. SO₄²⁻). La presencia del residuo D558 parece provocar el cierre de las regiones que conforman la cavidad catalítica de PRL-1, el P-loop, y el WPD-loop. La densidad electrónica de los residuos D558 de CNNM2 y R110 de PRL-1 se muestra en color verde. (B) Representación de la superficie de PRL-1, donde se muestran las cuatro regiones que conforman la cavidad catalítica (asterisco rojo) (C) La mutación puntual del residuo D558 por una alanina, impide completamente la formación del complejo, en células HeLa cotransfectadas con GST-PRL-1 o GST solo, en presencia de

Resultados

CNNM2-V5 o CNNM2-V5 D558A. **(D)** Mutaciones de los residuos F526, D528, V551 o N553 (localizadas en la interfaz entre proteínas y señaladas en rojo en el estereopar situado encima) por alanina o treonina, no son suficientes para impedir la formación del complejo en células HeLa cotransfectadas con GST-PRL-1 y CNNM2-V5 o CNNM2-V5 con las mutaciones descritas. En **C** y **D** el pulldown se realizó mediante resina de GST utilizando extractos celulares y confirmando la presencia o no de proteína mediante *Western Blot* con anticuerpos anti V5 o GST. GFP y GST se utilizaron como controles negativos. TCL es el lisado celular total.

Con el objetivo de confirmar el papel relevante de la región L553-559, realizamos mutaciones puntuales en esta zona, y encontramos que el mutante D558A disocia completamente la interacción entre CNNM2_{BAT} y PRL-1. Inesperadamente comprobamos que la sustitución de residuos localizados en la región adyacente a las láminas $\beta 5$ y $\beta 6$, por alanina, treonina y asparagina (F526A, D528A/D528N, V551A/V551T o N553A/N553T) no es suficiente para impedir la formación del complejo, lo que sugiere un papel secundario para estos residuos en la interacción entre CNNM2_{BAT} y PRL-1 (Fig.4.26.D). Por otro lado, la mutación de la glicina en posición 565 (G565), en el centro de la lámina $\beta 6$, debilita la interacción entre las proteínas, probablemente debido a que la lámina $\beta 6$ se desorienta y transmite esta alteración estructural a la región que la precede en la cadena polipeptídica. Estos resultados subrayan el papel de la región L556-559 y van en consonancia con el estudio de Kostantin y colaboradores²³¹ donde se mostró que la sustitución del aspartato D446 de CNNM3 (equivalente al residuos D558 CNNM2) impide la formación del complejo entre CNNM3-PRL-2.

Los cambios más significativos que sufre PRL-1 al acomplejarse con CNNM2 afectan a la orientación de los elementos que configuran las paredes de la cavidad catalítica de PRL-1. Estos elementos son el "P-Loop" (residuos 103-110), el "WPD-Loop" (residuos 68-77), el "TI-Loop" (residuos 137-143) y el " $\beta 3\alpha 2$ -loop" (residuos 48-55)^{267,268} (Fig 4.26. **B**). PRL-1 contiene el motivo conservado del sitio activo HCX₅R, el P-loop, y el WPD-loop, que son características diferenciales de las Tirosina-fosfatasa o PTPs²⁶⁸. Sin embargo, también presenta una fuerte similitud con las fosfatasa duales (DSPs)²⁶⁷, lo que sugiere que PRL-1 puede desfosforilar tanto tirosina como serina/treonina. Al formarse el complejo CNNM2·PRL-1, los *loops* P- y WPD- se acercan a la región central de la cavidad catalítica e interaccionan con el aspartato D558 situado en el extremo del loop L553-559 de CNNM2_{BAT}. Esta interacción es similar a la que establecen los *loops* de PRL-1 con los sustratos o análogos de sustrato (ej. SO₄²⁻) presentes en la cavidad catalítica de PRL-1, y configuran una conformación "cerrada" que impide el acceso de nuevas moléculas en el interior de la cavidad, inhibiendo su actividad fosfatasa (Fig.4.26, **A**, *derecha*, Fig.4.27. **A**, **B** y **C**).

Resultados

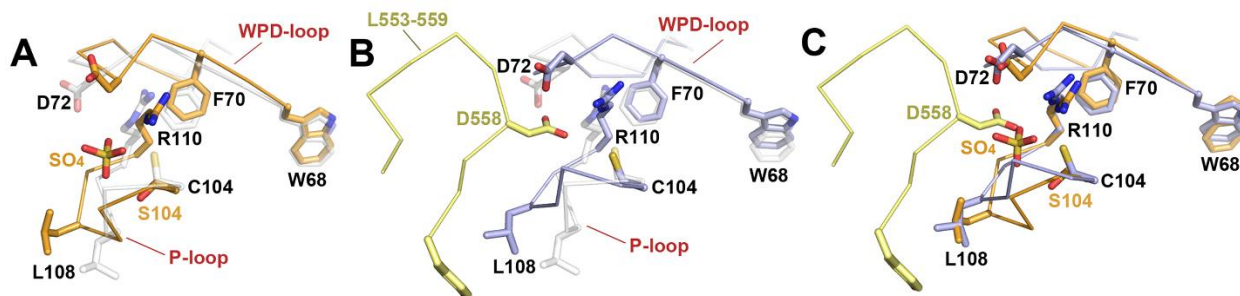


Figura 4.27 Efecto de CNNM2 sobre PRL-1.(A) Superposición del WPD- y P-loops de PRL-1, en su conformación apo (gris claro) y con un análogo de sustrato unido (naranja). Tras la unión del SO_4^{2-} ambas regiones se acercan a la posición del sustrato dando lugar a una conformación cerrada.(B) Superposición del WPD- y P- loop de PRL-1 en su conformación apo (en gris claro) y formando el complejo con CNNM2_{BAT} (azul). La región L553-559 está representada en amarillo.(C). Superposición del WPD- y P-loop de PRL-1 con SO_4^{2-} unido y en complejo con CNNM2_{BAT} (en naranja y azul respectivamente). La unión de CNNM2_{BAT} provoca el cierre de los loops que conforman la cavidad catalítica de PRL-1 sobre el loop de CNNM2, de forma similar a cuando se unen sustratos. El residuo D558 ocupa una posición similar al del SO_4^{2-} .

Además, cuando el complejo se encuentra formado, la arginina 110, presente en el motivo conservado H CX_5R , gira hacia el aspartato 72, de la misma manera que cuando hay un sustrato unido, neutralizando por tanto la repulsión electrostática que existiría entre el aspartato 558 de CNNM2 y el aspartato 72 de PRL-1 (Fig. 4.27). En general, las interacciones presentes contribuyen a mantener el WPD-loop en un estado similar a cuando se encuentra un sustrato unido. Otras interacciones relevantes son las interacciones hidrofóbicas que involucran a residuos del P-loop de PRL-1 (V105, A106, L108, y la cadena alquílica del residuo R110) y de la región L553-559 de CNNM2 (P559, F560, Y561). Los residuos A140, P7 y F141 de PRL-1, también contribuyen a mantener el entorno hidrofóbico. Por otro lado, las cisteínas presentes en la cavidad catalítica de PRL-1, involucradas en la reacción de desfosforilación (C49 y C104 de PRL-1) permanecen formando un puente disulfuro, y, por tanto, no parecen estar involucradas en la formación del complejo.

Además de la región L553-559 de CNNM2 y de la cavidad catalítica PRL-1, también participan en la interacción entre ambas proteínas otros elementos. Por parte de CNNM2, participan residuos de la región C-terminal de la lámina β 4 (F526) y β 5 y de la región N-terminal de la lámina β 6. En el caso de PRL-1, también participan residuos de la última vuelta de la hélice α 5 (residuos R134 y Q135), de la región entre las hélices α 5 y α 6 (136-142), de la primera vuelta de la hélice α 6 (S143 y K144), los residuos centrales del WPD-Loop (71-73) y del P-loop (106-198). Además, la arginina 138 (al comienzo de la región que une las hélices α 5 y α 6) y la lisina 144 de PRL-1, forman puentes salinos con el aspartato 528 (localizado en la región que precede la hélice H3 en CNNM2, y el glutamato 556 (en el extremo del L553-559) respectivamente. Además, la arginina 138 forma un enlace de hidrógeno con el asparagina 527.

Resultados

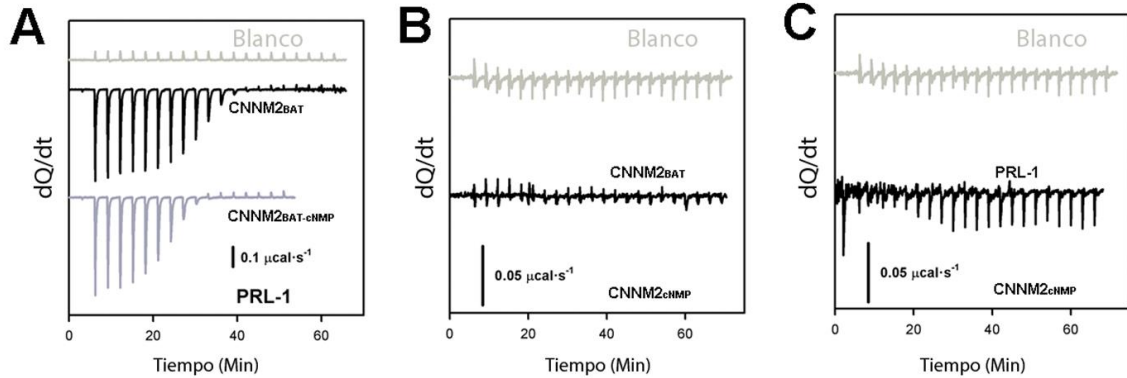


Figura. 4.29. Valoraciones calorimétricas de la afinidad por PRL-1 de CNNM2_{BAT} y CNNM2_{CNMP}. (A) Titulaciones con el tampón (blanco), CNNM2_{BAT} (23 μM) y CNNM2_{BAT}-cNMP (29 μM) con PRL-1 (540 μM). (B) Titulación con CNNM2_{BAT} y CNNM2_{CNMP} (780 μM). (C) Titulaciones de PRL-1 con CNNM2_{CNMP}. B y C comparten el mismo blanco, el cual se obtuvo después de la titulación del tampón con CNNM2_{CNMP} (780 μM)

Por otro lado, también medimos la interacción entre el módulo Bateman y el dominio cNMP de CNNM2. Realizando este experimento observamos que estos dos dominios no interaccionan entre sí lo cual sugiere que son dominios que actúan como módulos independientes.

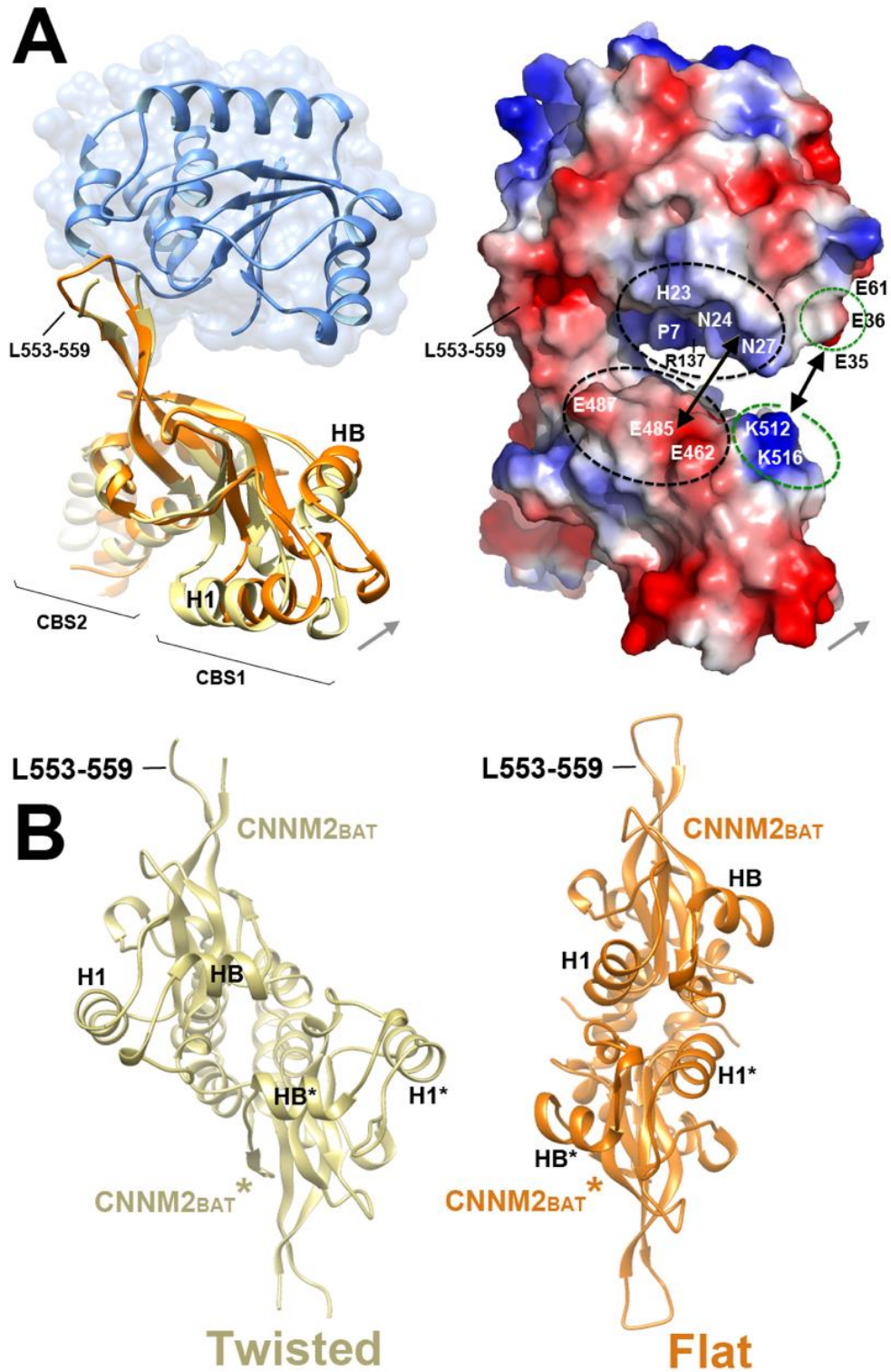
4.6.4. La unión de PRL-1 aplanar el módulo CBS de CNNM2.

La estructura cristalina del complejo CNNM2_{BAT}-PRL-1, mostró de forma inesperada, que el módulo CBS central (homodímero 2xCNNM2_{BAT}) adopta una conformación de disco plano ("Flat") en lugar de la conformación "Twisted" que en principio se espera en ausencia de nucleótidos unidos²⁰⁹. Esta conformación plana es equivalente a la que adopta el módulo CBS en presencia de MgATP o en el mutante T568I, que impide la unión del ATP pero mimetiza su efecto de forma permanente interrumpiendo las interacciones entre los dos dominios CBS del módulo Bateman de forma análoga al efecto que ejerce el nucleótido cuando se encuentra alojado en la cavidad S2 del módulo Bateman²⁰⁹. La conformación plana encontrada en el complejo parece que se favorece por la presencia de cargas de signo opuesto, las cuales, debido a su situación a lo largo de la superficie de las dos proteínas, ejercen una atracción mutua que causa el desplazamiento progresivo del motivo CBS1 de CNNM2 hacia la región C-terminal de la lámina β2 y la región N-terminal de la hélice α1 de la proteína PRL-1. Entre los residuos implicados están el E462, E485, E487, K512, K516 de CNNM2 y H23, N24, N27, E35, E36, E61 de PRL-1 (Fig. 4.30)

Los datos obtenidos sugieren que la unión de PRL-1 a la conformación "Twisted" del dímero de CNNM2_{BAT} provoca un giro concomitante de los motivos CBS1 de subunidades complementarias. Esta reorganización altera las interacciones entre las hélices interfaciales que unen los dos módulos Bateman que conforman el módulo CBS,

Resultados

permitiendo el cambio de una conformación “*Twisted*” a la conformación plana. Además, como CNNM2 interactúa con PRL-1 principalmente a través del motivo CBS2 parece que la transición de “*Twisted*” a “*Flat*” se puede llevar a cabo sin alterar la orientación relativa entre CNNM2 y PRL-1 (Fig. 4.30)



Resultados

Figura. 4.30. La unión de PRL-1 aplanada a CNNM2_{BAT}. **A, izquierda.** Estructura de apo-CNNM2_{BAT}²⁰⁹ en amarillo, superpuesta con la estructura del complejo con PRL1 (CNNM2_{BAT} en naranja, y PRL-1 en azul. **Derecha.** Representación de la superficie y del potencial electrostático del complejo CNNM2_{BAT}-PRL-1. Los residuos con carga positiva y negativa se representan en azul y rojo respectivamente. La unión de PRL-1 a CNNM2_{BAT} provoca un movimiento (indicado con una flecha) del motivo CBS1 el cual tiene un efecto similar a la unión de MgATP. Esta reorganización estructural se favorece por una atracción electrostática entre residuos de carga opuesta los cuales se encuentran distribuidos en la superficie entre ambas proteínas. **B** Este cambio conformacional hace que el módulo CBS (dímero de dos CNNM2_{BAT}) evolucione desde una conformación "twisted" a una conformación "flat".

4.6.5. La unión de ATP no varía conformacionalmente el complejo CNNM2_{BAT}-PRL-1.

Una vez elucidada la estructura cristalina del complejo CNNM2_{BAT}-PRL-1, y estando descrito que CNNM2_{BAT} tiene la capacidad de ATP de manera Mg²⁺ dependiente, así como iones Mg²⁺ libres, decidimos estudiar la estructura del complejo en presencia de estos ligandos para ver si se inducían cambios conformacionales adicionales a los observados tras la formación del complejo con PRL-1. Para ello, crecimos cristales del complejo CNNM2_{BAT}-PRL-1, en presencia de ATP y Mg²⁺ o Zn²⁺ (añadidos como MgCl₂ o ZnCl₂, respectivamente) La presencia de iones de Zn²⁺ y de ATP en la solución de cristalización, provocaron una serie de pequeños cambios estructurales que resultaron en una reorganización de las moléculas del cristal, de tal manera que la estructura se resolvió en el grupo espacial monoclinico C2. Los parámetros cristalográficos y de refinamiento se muestran en la tabla 4.5. La unidad asimétrica contiene un heterotetrámero 2xCNNM2_{BAT} y 2xPRL-1. En estos cristales, las subunidades de CNNM2_{BAT} (y sus moléculas de ATP unidas) que forman el módulo CBS están relacionadas por un eje de simetría binario no cristalográfico.

De la misma manera que estaba descrito para el módulo Bateman aislado, encontramos que el ATP se une al sitio S2 de cada módulo Bateman en el complejo (Fig.4.31). Sin embargo, la unión de nucleótidos al complejo apenas induce cambios conformacionales respecto de la forma sin nucleótidos unidos. Solo se aprecia una sutil aproximación de los motivos CBS1 de los módulos Bateman complementarios. Por tanto, parece que la unión de MgATP o de ZnATP actúa en la misma dirección que la fosfatasa, reforzando los cambios conformacionales inducidos por PRL-1. Los cationes de Zn²⁺ se sitúan entre los fosfatos α y γ , estabilizando la cadena trifosfato del ATP y neutralizando la repulsión electrostática ejercida por los residuos ácidos E570, D571 y E574 situados en el sitio S2 del módulo Bateman (Fig.4.31, **B**). Estos átomos de Zn²⁺ coinciden con la posición de los átomos de Mg²⁺ encontrados previamente en el estudio de Corral-Rodríguez y colaboradores²⁰⁹. Además, también aparecen dos cationes de Zn²⁺ coordinados con el residuo D506 y con el residuo D504 de la subunidad complementaria, ambos pertenecientes a la hélice H2B del motivo CBS1 (Fig.4.31.**C**).

Resultados

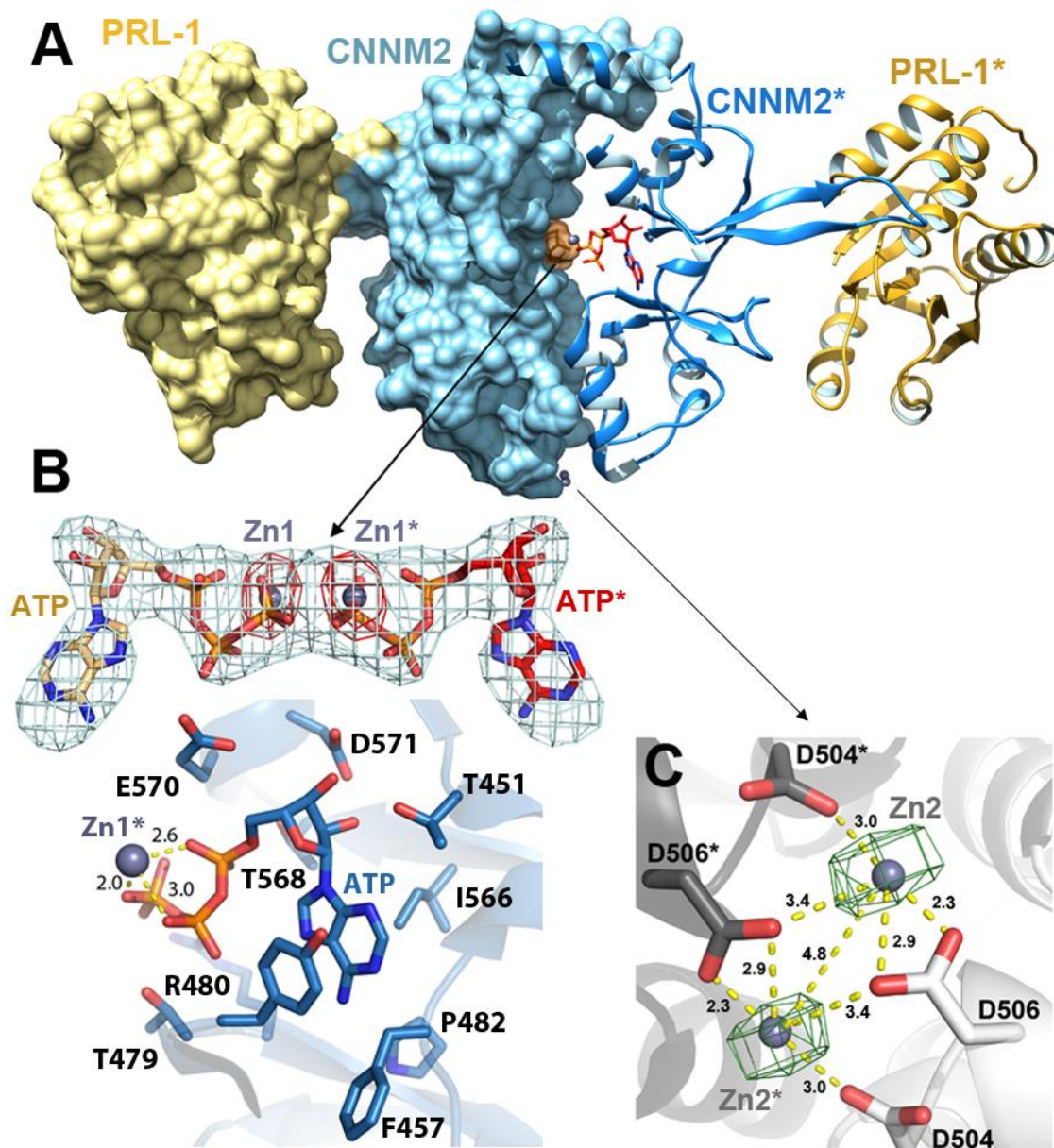


Figura 4.31. El complejo CNNM2_{BAT}-PRL-1 interacta con ZnATP. (A) Estructura del complejo CNNM2_{BAT} con PRL-1. El módulo CBS se representa en color azul y las moléculas de PRL-1 en color amarillo. En el centro se muestra el ZnATP unido. (B, *Arriba*) Mapa de densidad electrónica correspondiente al ZnATP que confirma la presencia de ATP y no ADP unido. (*Abajo*) Los residuos del sitio S2 involucrados en la interacción con ZnATP se muestran en detalle. La repulsión electrostática ejercida por los residuos E570 y D571 se neutraliza por la presencia de un ión Zn²⁺ entre los fosfatos α y γ . Las distancias interatómicas están representadas en amarillo. (C) Detalle de los residuos implicados en la unión de Zn²⁺ en el extremo del motivo CBS1. El *omit map* Fo-Fc del Zn²⁺ se representa en verde y las distancias interatómicas en amarillo.

En estudios previos a este trabajo²⁰⁹, se demostró que a pH neutro y en ausencia de cationes divalentes, el módulo Bateman de CNNM2 cataliza la hidrólisis de ATP hacia ADP a pH 7 de forma muy lenta, insignificante a nivel biológico. También se demostró que la barrera de entrada del ligando se reduce significativamente tras la unión de Mg²⁺ y que, nucleótidos con cadena polifosfato corta como el AMP (lo que también implica menor carga negativa) favorecen la interacción proteína-ligando. Por tanto, la presencia de residuos ácidos, como los residuos E570, E571, y E574 en el sitio S2 sugiere que la

Resultados

entrada de una cadena polifosfato como la del ATP no esté favorecida. Por ello, decidimos analizar el comportamiento del ATP en solución, tanto en presencia como en ausencia de la proteína, para ver si la hidrólisis observada a pH7 se reproduce en las condiciones de cristalización, a pH 4.6 y confirmar la presencia del ATP en nuestras estructuras. Para ello, monitorizamos la hidrólisis del ATP por el módulo Bateman de CNNM2 y por el complejo formado por CNNM2_{Bat} y PRL-1, mediante resonancia magnética nuclear con ³¹P. En las condiciones testadas, ni CNNM2_{BAT} ni el complejo con PRL-1, catalizaron hidrólisis de ATP formando ADP y fosfato libre en presencia de Zn²⁺ y/o en un medio ácido. Esto se cumplió para los dos experimentos en el tampón de cristalización, lo que explica porque en la estructura encontramos moléculas intactas de ZnATP.

En consonancia, el *omit map* Fo-Fc resultante de omitir el ATP o los fosfatos y con el objetivo de amplificar esas regiones del mapa de densidad electrónica, confirmó la presencia de dos moléculas de ATP completas en el módulo CBS (Fig 4.31.B). Por otro lado, calculando el *omit map* mFo-DFc, observamos densidad residual consistente con la presencia de átomos de Zn²⁺ unidos a los fosfatos α y γ de cada molécula de ATP, y también en el extremo del motivo CBS1. La carga positiva de estos iones divalentes reduce la repulsión electrostática que existe entre las cadenas polifosfato del ATP y los residuos ácidos E570, D571, y E574 estabilizando por tanto la presencia de ATP en el sitio S2 (Fig 4.31. B).

4.7. ESTRUCTURA DEL COMPLEJO CNNM4_{BAT}-CNMP-CTAIL CON PRL-1.

Tras demostrar que la interacción entre CNNMs y PRLs, implica esencialmente al módulo Bateman de los CNNMs y a la cavidad catalítica de las fosfatasas, y que el dominio cNMP de los CNNMs no interacciona (o lo hace de forma muy débil), ni con el dominio Bateman ni con las PRLs²⁶⁹, nuestro esfuerzo se centró en intentar elucidar la orientación relativa de los dominios intracelulares de los CNNMs. Para ello intentamos cristalizar constructos de las proteínas CNNM2 o CNNM4 que contenían la región intracelular completa de estas proteínas, tanto en presencia como en ausencia de su ligandos (MgATP y Mg²⁺) y de la fosfatasa PRL-1. Sin embargo, a pesar de un enorme esfuerzo experimental, todos los intentos de cristalización fueron infructuosos. Alternativamente, decidimos emplear técnicas complementarias como la Criomicroscopía electrónica (Cryo-EM) (estudio en progreso no incluido en esta tesis) y la dispersión de rayos-X a bajo ángulo (SAXS). Los constructos elegidos para el análisis SAXS incluían la cola C-terminal. Los mejores resultados se obtuvieron con el constructo CNNM4_{BAT}-cNMP-Ctail y la fosfatasa PRL-1. Una vez purificado el complejo CNNM4_{BAT}-cNMP-

Resultados

c_{tail}-PRL-1 (ver detalles en la sección 3.1 de Materiales y Métodos), lo analizamos en la línea de SAXS B21 del sincrotrón Diamond Light Source (Didcot, UK). El complejo se analizó tanto en ausencia como en presencia de 5mM de MgATP, con el objetivo de ver si se producían cambios conformacionales adicionales en el dominio cNMP o en su orientación relativa con respecto al módulo Bateman al unir ATP. Los parámetros obtenidos fueron muy similares en presencia o en ausencia de los ligandos: los valores de R_g y D_{max} fueron 48Å/185Å y 47Å/183Å respectivamente. El volumen de Porod es consistente con la presencia de un heterotetrámero 2xCNNM4_{BAT-cNMP-Ctail} + 2xPRL-1. El exponente de Porod es 3.1 en ambos casos, lo que muestra una molécula más compacta que flexible (Tabla 4.6).

Tabla 4.6. Parámetros de Colecta y procesado de SAXS

Parámetros de Colecta		
Línea de Sincrotrón	B21, Diamond Light Source, Harwell (UK)	
Detector	Pilatus 2M	
Tamaño del haz	0.2 x 0.2 mm	
Energía	12.4 keV	
Distancia al detector (mm)	4014	
q (Å ⁻¹)	0.0038 - 0.42	
Tiempo de exposición (s)	3	
No de Imágenes	620	
Temperatura (K)	293	
Método	SEC online	
Parámetros estructurales		
Constructo	CNNM4_{BAT-cNMP-Ctail} + PRL-1	CNNM4_{BAT-cNMP-Ctail} + PRL-1+ MgATP
Código SASBDB	SASDEP8	SASDEN8
Concentración (mg mL ⁻¹)	8.5	5.0
q Interval for Fourier inversion (Å ⁻¹)	0.09-0.173	0.009-0.125
R_g [de P(r)] (Å)	47.90 ± 5.24	47.20 ± 2.55
R_g [aproximación de Guinier] (Å)	46.55 ± 0.81	44.48 ± 1.42
Límites sR_g [aproximación de Guinier]	0.36 – 1.29	0.38-1.29
D_{max} (Å)	185	183
Volumen de Porod (nm ³)	226	216
Exponente de Porod	3.1	3.1
Peso molecular (kDa)		
Del volumen de Porod (x0.53)	120	115
A partir de la secuencia	68	68
Software empleado		
Reducción de datos	DAWN pipeline (Diamond Light Source, UK)	
Procesamiento de los datos	ScÅtter v3.1v	
Modelado <i>Ab initio</i>	GASBOR	
Validación	DAMAVER/DAMCLUST	
Cálculo de intensidades del modelo	CRY SOL	

$$q = 4\pi \sin(\theta/\lambda), \text{ donde } 2\theta \text{ es el ángulo de dispersión (scattering) y } \lambda \text{ es la longitud de onda.}$$

En consistencia con estos datos, los modelos *ab initio* obtenidos en ambas condiciones (presencia o ausencia de MgATP) (materiales y métodos sección 3.5), son similares. La estructura tridimensional final, una vez añadido el segmento de cadena que une el módulo Bateman con el dominio cNMP usando el programa CORAL²⁵⁴ se muestra

Resultados

en la Fig 4.32. Teniendo en cuenta que CNNM2 y CNNM4 sólo difieren en la identidad de 4 residuos en el módulo Bateman, y que sólo se conoce la estructura cristalina de CNNM2 unida a MgATP y a PRL-1, decidimos emplear las coordenadas de la estructura cristalina del complejo CNNM2_{BAT}.PRL-1 (Código PDB: 5LXQ)²⁶⁹ para reconstruir la región equivalente de CNNM4 acomplejada a la fosfatasa. Las coordenadas del dominio CNNM4_{cNMP} son las derivadas de nuestros cristales (sección 4.3) El valor de ajuste entre los datos experimentales y el modelo construido en base a los datos de SAXS fue de $\chi^2=1.82$. Tanto el modelo como la curva se muestran en la figura 4.29.

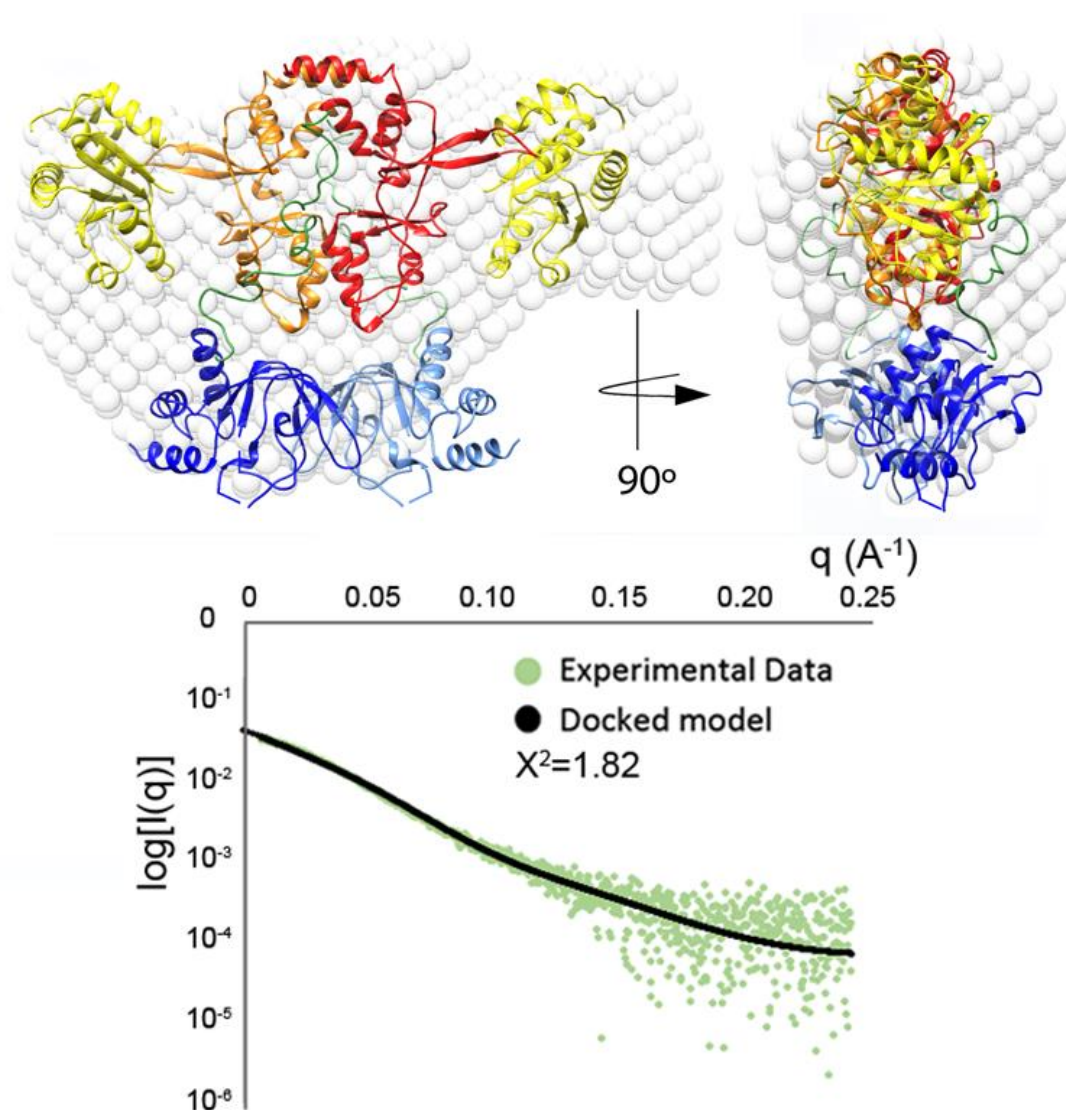


Fig. 4.32 Estructura en solución del complejo CNNM4_{BAT}-cNMP-Ctail-PRL-1 (Arriba). El volumen *ab initio* obtenido (esferas de color gris claro) concuerda con un dímero de CNNM4 (módulo CBS en rojo y naranja respectivamente, y dímero del dominio cNMP en azul claro y oscuro) unido a dos moléculas independientes de PRL-1 (en amarillo). Las regiones entre el módulo Bateman y el dominio cNMP se muestran en verde (linker). (Abajo) El valor de ajuste entre los datos experimentales de SAXS (verde) y los datos teóricos del modelo (negro) fue de $\chi^2=1.82$.

Resultados

5. Discusión

Discusión

Desde su descubrimiento en el año 2003¹⁵³, numerosos estudios han intentado esclarecer la función biológica de los CNNMs, cuyo interés ha ido creciendo por su implicación en diversas patologías, entre las que se incluyen alteraciones neuropsiquiátricas como la esquizofrenia¹⁵⁷, enfermedades raras como la hipomagnesemia familiar dominante¹⁵⁶ o el síndrome de Jalili¹⁹¹, infertilidad²⁰³ y cáncer^{158,160,270}. Sin embargo, a pesar de haberse demostrado su inequívoca implicación en el transporte y en la homeostasis del Mg^{2+} en diferentes órganos, los resultados obtenidos no son concluyentes o son contradictorios. Algunos autores han propuesto que son transportadores directos que median la extrusión de Mg^{2+} mediante el intercambio con iones $Na^{+159,160,271,272}$. Otros los consideran sensores de la concentración intracelular de Mg^{2+} que modulan indirectamente la actividad de otros transportadores o canales (aún no identificados)^{156,157,175,273}.

El objetivo principal de esta tesis doctoral ha sido incrementar el conocimiento estructural de los CNNMs, muy escaso cuando iniciamos el trabajo, y aportar luz sobre los mecanismos moleculares de transporte de Mg^{2+} que modula esta familia de proteínas. Para ello hemos caracterizado cristalográfica y biofísicamente la región intracelular de dos de sus cuatro miembros en mamíferos, CNNM2 y CNNM4. La información obtenida es muy probablemente extrapolable al resto de la familia, ya que muchas de las propiedades descubiertas se encuentran conservadas, aunque confirmar esta hipótesis queda pendiente para estudios futuros. El trabajo realizado nos ha permitido identificar los residuos claves en la interacción entre los CNNMs y sus ligandos, ATP y Mg^{2+} , y desvelar las bases estructurales de la interacción que establecen con los tres miembros de la familia de fosfatasas PRL. Estos datos sientan las bases para el desarrollo de fármacos que impidan su asociación oncogénica. Finalmente, la combinación de técnicas de difracción de Rayos X (Cristalografía macromolecular y SAXS), aproximaciones calorimétricas (ITC) y espectroscópicas (RMN), nos ha permitido reconstruir un modelo tridimensional de la región intracelular completa de CNNM2 y CNNM4.

Los módulos Bateman de CNNM2 y CNNM4 comparten ligandos y características oligoméricas y conformacionales.

Nuestra estructura cristalina del módulo Bateman de CNNM4 sugiere que su cavidad S2 puede acomodar ATP de manera Mg^{2+} dependiente, como habíamos observado anteriormente en CNNM2^{155,209}. De forma análoga a CNNM2, la afinidad por el nucleótido es débil ($K_D \approx 10^{-2} - 10^{-3}$ M), a causa de la presencia inusual de residuos ácidos

Discusión

localizados en el interior de la cavidad. Esta región ácida ejerce una repulsión electrostática con la cadena polifosfato del ATP, que se reduce en presencia de iones Mg^{2+} , permitiendo así la unión con el nucleótido dentro de límites fisiológicos (1-10mM). La afinidad por el Mg^{2+} libre también es baja (en el rango milimolar), lo que contrasta con el valor que muestran otros transportadores o sensores de Mg^{2+} . Sin embargo, este valor de afinidad podría ser relevante para que la extrusión de Mg^{2+} hacia el exterior se realice solo por encima de ciertos límites de concentración intracelular. Por ejemplo, el canal procariota MgtE, importa cationes Mg^{2+} hacia el interior de las bacterias formando un poro cuya apertura regula mediante la interacción progresiva de iones Mg^{2+} con residuos ácidos del módulo Bateman^{61,63}. Curiosamente, la afinidad de este dominio por el Mg^{2+} se incrementa mediante la unión previa de ATP (y no al revés como hemos observado en los CNNMs), definiendo así el cierre del poro solo cuando se alcanza una concentración de Mg^{2+} suficiente dentro de un rango con sentido fisiológico. De no producirse el aumento de afinidad por los cationes Mg^{2+} que favorece la unión de ATP, el canal permanecería permanentemente abierto causando una acumulación intracelular del ión que resultaría tóxica para la bacteria⁶⁹. Este mecanismo⁶⁹ es antagónico al que muestra CNNM4, en el que es el Mg^{2+} el que incrementa la afinidad por el ATP^{155,209}. Curiosamente, la dirección de transporte en MgtE y en CNNM4 a través de la membrana transcurre en direcciones opuestas (MgtE importa mientras que CNNM4 extruye Mg^{2+}), de forma análoga a la afinidad inversa de sus dos ligandos, Mg^{2+} y ATP^{155,159,160}. Nuestros datos indican que los CNNMs median un mecanismo de transporte relacionado con el de MgtE, pero en el que Mg^{2+} y ATP desempeñan papeles inversos, como inversa es la dirección en el movimiento de los cationes que modulan. A falta de confirmar si el transporte mediado por los CNNMs es directo o indirecto, postulamos que estos factores homeostáticos desempeñan una función sensora de la concentración intracelular de Mg^{2+} y, adicionalmente, una función reguladora de la extrusión de este catión a través de las membranas celulares. Dicha extrusión es necesaria no solo para regular la concentración del catión en el interior de las células del órgano en el que se expresan los CNNMs, sino también para regular la concentración de Mg^{2+} en el torrente sanguíneo, asegurando que a la sangre pasa la cantidad suficiente de este nutriente. En los epitelios del riñón, o del intestino, por ejemplo, en los que CNNM2 y CNNM4 se expresan basolateralmente, la débil afinidad por el Mg^{2+} , permitiría que la extrusión del catión desde el lumen hasta el sistema circulatorio sólo se produzca a una concentración relativamente alta, evitando así la saturación del transportador a concentraciones bajas que inhibirían su absorción por parte del organismo. Los datos de que disponemos sugieren que solo tras alcanzar un umbral de concentración de Mg^{2+} (que ciframos en el rango milimolar), provocado por la

Discusión

entrada progresiva de este catión a la célula a través de canales como TRPM6/M7, se favorece la unión de ATP a la proteína. La unión de este nucleótido induce el cambio conformacional del módulo CBS que provoca el proceso de extrusión (directo o indirecto). Mutaciones como T568I, que inhiben la flexibilidad conformacional del módulo CBS y que lo bloquean en su conformación “flat” (plana), inhabilitan también su capacidad de transportar o de regular el transporte de Mg^{2+} (probablemente su extrusión). En el caso del riñón, este mecanismo explica la hipomagnesemia detectada en pacientes portadores de la mutación T568I¹⁵⁶

Las proteínas CorC (proteína que se ha relacionado con la regulación de la extrusión de Mg^{2+} a través del canal bacteriano CorA ^{11,37,47}) y SA0657 (proteína que se ha propuesto que media la extrusión de Mg^{2+} en *S.Aureus*)^{40,153}, podrían comportarse de forma similar a CNNM2 o CNNM4, ya que presentan homología con los CNNMs en la cavidad de unión al ATP. Ambas proteínas contienen un módulo Bateman que une nucleótidos ^{40,51} y SA0657, además contiene una región transmembranosa DUF21 similar a la de los CNNMs ⁴⁰. Las regiones equivalentes al sitio S2 de los CNNMs en CorC y SA0657, presentan residuos ácidos en las mismas posiciones que los CNNMs (E182, D183 y E186, y E331, D332, y E335 respectivamente, los equivalentes en CNNMs se muestran en la figura 5.1) que desfavorecen la entrada de una cadena de polifosfato larga. De hecho, la única estructura resuelta del módulo Bateman de CorC tiene unido AMP y no ATP ⁵¹ (Fig 4.4 resultados). Por otro lado, se ha demostrado que el módulo Bateman de SA0657 (cuya estructura tridimensional se desconoce), es clave en la tolerancia al Mg^{2+} de *S.Aureus*..

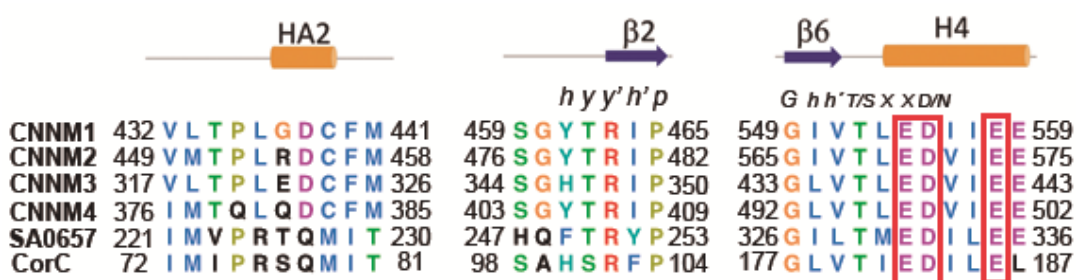


Figura 5.1. Alineamiento de los tres bloques estructurales que forman el sitio S2 en diferentes proteínas. Los residuos ácidos conservados que previenen la unión de ATP en ausencia de Mg^{2+} se marcan con un rectángulo rojo. Los elementos de estructura secundaria se representan encima del alineamiento.

Las características similares entre CorC, SA0657 y los CNNMs, y el mecanismo opuesto a MgtE sugieren un mecanismo de extrusión de Mg^{2+} relacionado entre las bacterias y los eucariotas superiores, en el que el módulo Bateman de estas proteínas actúa como sensor de la concentración intracelular de Mg^{2+} , determinando también el

Discusión

límite a partir del cual se activa o se inhibe el transporte de este catión, así como la direccionalidad del mismo a través de las membranas celulares.

Por otro lado, las pequeñas diferencias que existen en la secuencia de aminoácidos que configuran la cavidad de unión a ATP de diferentes miembros de la familia CNNM, podrían explicar el diferente umbral de extrusión que requieren diferentes órganos para regular la homeostasis de este catión. Es conocido que CNNM2 se sobreexpresa principalmente en la membrana basolateral del DCT de la nefrona, mientras que CNNM4 lo hace esencialmente en la membrana basolateral del enterocito. En el DCT, solo se reabsorbe aproximadamente un 10% del Mg^{2+} filtrado por el glomérulo, puesto que la mayoría ya ha sido reabsorbido en el TAL mediante transporte paracelular^{21,96,107}. Parece razonable pensar que, aunque hace falta llegar a una concentración intracelular mínima de Mg^{2+} para realizar el transporte hacia la sangre, esta concentración deba ser menor en el DCT que en el enterocito (encargado de realizar una absorción gruesa del Mg^{2+} que se ingiere en la dieta).

Como demuestran nuestros estudios SEC-MALS y SAXS, otra función importante del módulo Bateman, también observada en otras proteínas de función no relacionada que contienen dominios CBS^{65,67,68,274,275}, es su papel en mantener la dimerización de la proteína. Nuestros cristales han permitido confirmar que, de forma similar a CNNM2^{209,269} y a CNNM3²⁷⁶ el dominio CNNM4_{BAT} se asocia consigo mismo formando un módulo CBS. En los cristales de CNNM4, el disco adopta una conformación “*semitwisted*”, intermedia entre los estados “*twisted*” y “*flat*” observados en CNNM2, probablemente por el apantallamiento que ejercen los iones Na^+ presentes en la solución sobre la repulsión electrostática que existiría entre *clusters* ácidos de los dominios CBS1 complementarios (Apartado 4.2.1, Resultados). Teniendo en cuenta que el módulo Bateman de CNNM2 y CNNM4 son prácticamente idénticos (solo difieren en cuatro residuos), es razonable pensar que, en solución, CNNM4_{BAT} sigue un comportamiento homólogo al observado anteriormente en CNNM2²⁰⁹.

Estructura y función del dominio cNMP.

La estructura cristalina del dominio cNMP de CNNM4, junto con los experimentos de ITC han revelado que este módulo intracelular es estructuralmente homólogo a los dominios de unión a nucleótidos cíclicos (CNBDs, por siglas en inglés “*Cyclic nucleotide binding homology domain*”) de otras proteínas. Sin embargo, a diferencia de éstos, no une, ni se regula, por la unión de AMPc o GMPc. Esta incapacidad de debe a que la cavidad central de su β -roll se encuentra ocluida por la presencia de residuos

Discusión

hidrofóbicos voluminosos. La imposibilidad de unir cAMP o cGMP de los CNNMs no es exclusiva de esta familia de proteínas, y se observa también en los dominios conocidos como CNBH (“*cyclic nucleotide binding homology domains*”), que también presentan un plegamiento similar. Los dominios CNBH regulan, por ejemplo, la actividad de canales de K⁺ activados por voltaje (KCNH) (Fig. 5.2.), que en las neuronas producen una corriente de K⁺ hiperpolarizadora externa que los estímulos excitatorios deben superar para generar un potencial de acción⁸. Los CNBH presentan una estructura y conformación general igual a la que presentan los dominios cNMP de los CNNMs, y la cavidad central de su β -roll también se encuentra ocluida por tres residuos voluminosos (motivo Tyr/Fe-Leu-Asn) que impiden la entrada de un nucleótido cíclico²⁶³ (Fig. 5.2.). Sin embargo, a diferencia de los CNNMs, estos tres residuos provienen de una pequeña lámina β (β 9) situada al final de la hélice α C presente en la región C-terminal de los dominios cNMP clásicos (Fig. 5.2.), y no pertenecen a los elementos que configuran el interior de la cavidad como hemos observado en CNNM2 y CNNM4. Esta pequeña lámina β de los CNBHs, se introduce en la cavidad central de su β -roll de tal manera que la cadena lateral de la leucina ocupa la posición del motivo fosfato cíclico y la tirosina (o fenilalanina) ocupa el lugar del azúcar^{263,277}. En conclusión, la incapacidad de unir nucleótidos del dominio cNMP de los CNNMs difiere estructuralmente de la de los canales de K⁺ KCNH. Nuestra estructura del dominio cNMP de CNNM4 desvela, por tanto, una nueva estrategia autoinhibitoria de un dominio estructuralmente homólogo a los CNBH.

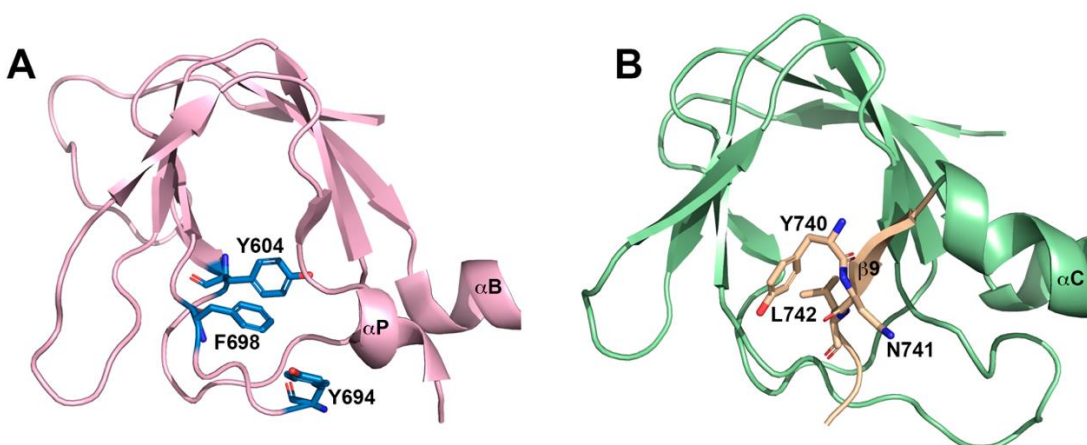


Figura 5.2. Estructura del dominio CNBH de CNNM4 y ELK. (A) representación del β -roll del dominio cNMP de CNNM4. Los residuos voluminosos que previenen la unión de un nucleótido cíclico (Y604, Y694 y F698) se representan en “sticks” de color azul. (B) representación del β -roll del CNBH de ELK, un tipo de KCNH (Código PDB 3UKN). Los residuos voluminosos que impiden la unión de un nucleótido cíclico (Y740, N741 y L742) provienen de una pequeña lámina β (β 9) situada a continuación de la última hélice (α C). Los residuos (en “sticks”) y la lámina β se representan color marrón.

Discusión

Por otra parte, se ha postulado que el motivo de tres residuos que ocluye la cavidad central del β -roll de los canales de K^+ KCNH, actúa como un ligando intrínseco que mimetiza los efectos estructurales que provoca la unión de un nucleótido cíclico²⁶³. Esta hipótesis se apoya en que la delección o mutación de algún residuo del ligando intrínseco altera las propiedades funcionales de los canales KCNH y acelera el cierre del poro^{278,279}.

En un artículo más reciente, se ha demostrado que el ligando intrínseco puede actuar como un modulador alostérico del canal, ya que inhibe su actividad antes de un proceso denominado potenciación dependiente de voltaje o VPD (proceso en el cual la apertura del canal se estabiliza por una despolarización previa) y lo activa después del VPD²⁷⁷. Los autores del trabajo proponen que el ligando intrínseco pasa de ser antagonista, a ser agonista como resultado de un pequeño reordenamiento de la interacción entre el CNBH y el dominio adyacente denominado EAG durante el VPD²⁷⁷. Queda pendiente de estudio saber si, de forma análoga, la presencia de los residuos que ocupan la cavidad del β -roll en CNNMs tiene alguna relevancia en la función de la proteína.

Durante el desarrollo de nuestro estudio, se publicó otro trabajo donde se describen las estructuras cristalinas del dominio cNMP de CNNM2 y CNNM3²⁸⁰. Estos datos confirman nuestros hallazgos con CNNM4, y muestra que la estructura del dominio cNMP de los CNNMs, así como su estado oligomérico, está conservado en toda la familia. Mediante la realización del mutante F631A hemos demostrado que el dímero presente en el empaquetamiento cristalino también existe en solución (la mutación desensambla los dímeros del dominio cNMP en entidades monoméricas). Estos datos demuestran que el dominio cNMP contribuye a la dimerización general de la proteína completa. En el trabajo publicado por Chen y colaboradores, se propuso que el dominio cNMP es el dominio que dirige la dimerización en los CNNMs²⁸⁰. Sin embargo, cuando realizamos el mutante F631A en un constructo que comprendía la región intracelular completa, es decir, también incluía al módulo Bateman y a la *C-tail*, el desensamblaje producido por el mutante no era tan evidente, (Fig 4.18, Resultados) como se observa en nuestros resultados de SEC-MALS. En contraste con las afirmaciones de Chen *et al*²⁸⁰, nuestros datos nos llevan a concluir que la dimerización de los CNNMs (al menos de CNNM4) no depende solo del dominio cNMP, sino que también (y en mayor proporción) es mediada por el módulo Bateman. Aunque la función del dominio cNMP se desconoce, se sabe que la eliminación de este dominio inhibe completamente la extrusión de Mg^{2+} mediada por CNNM4 en células HEK293²⁸⁰. También se observa una

Discusión

inhibición parcial de la extrusión en células que sobreexpresan el mutante F631A²⁸⁰. Aunque se desconoce el motivo por el que la delección del dominio inhibe el transporte, en 2014 se reportó que, tres motivos de di-leucina presentes en el dominio cNMP y la C-tail de CNNM4 (L575/576, L758/759 y L765/766), eran necesarios para la correcta localización de CNNM4 en la membrana basolateral. Estos motivos de dileucina son reconocidos por las subunidades μ 1A y μ 1B de la proteína adaptadora de clatrina 1 (AP-1), y guían a CNNM4 a su correcta localización final en la membrana basolateral²¹². Por tanto, podemos especular que la inhibición de la extrusión de Mg^{2+} se deba a que en ausencia del dominio cNMP, la localización de la proteína CNNM sea incorrecta. En cambio, el mutante F631A, que favorece el desensamblaje del dímero del dominio cNMP y que también presenta una capacidad de extrusión de Mg^{2+} reducida, se localiza correctamente en la membrana plasmática de las células que lo sobreexpresan²⁸⁰.

Nuestros resultados de SAXS y los modelos obtenidos, sugieren que la autoasociación del dominio cNMP aporta la matriz morfológica que define los límites del cambio conformacional “*Twisted-to-flat*” que sufre el módulo Bateman al unir MgATP, o tras la unión de la fosfatasa PRL-1. Nuestra hipótesis, basándonos en la complementariedad morfológica entre el disco del módulo CBS y el dímero del cNMP, es que la cavidad formada entre las dos subunidades de CNNM4_{cNMP} establece los límites del desplazamiento que sufren los motivos CBS1 durante el cambio conformacional. La distancia existente entre el módulo CBS y el dímero cNMP en el modelo tridimensional, así como la interacción muy débil que mantienen (inapreciable si se mide por ITC), sugiere la intermediación del *linker* que une ambos dominios intracelulares durante el cambio conformacional. Parece probable que dicho *linker* esté parcialmente localizado entre ambos módulos y facilite su movimiento gracias a su longitud y alta flexibilidad. Nuestros datos sugieren que la función del dominio cNMP no es solo estabilizar el dímero de la proteína, sino también delinear y dar soporte estructural al cambio conformacional del módulo Bateman, evitando el desensamblaje del dímero durante el proceso.

Bases estructurales de la interacción oncogénica de los CNNMs con las PRLs.

En línea con nuestros estudios sobre la familia de factores homeostáticos CNNM, también hemos resuelto la estructura cristalina del complejo formado por CNNM2_{BAT} con la fosfatasa PRL-1. En 2014, se descubrió la capacidad de las fosfatasas PRLs para interactuar con la familia CNNM, lo que conlleva un incremento en la concentración intracelular de Mg^{2+} que se relaciona con la progresión tumoral^{160,178,231}. Estos estudios establecieron por primera vez una conexión entre el cáncer y la homeostasis del Mg^{2+}

Discusión

mediada por los CNNMs. Hardy *et al*, utilizando tumores xenográficos en ratones, mostraron que células sobreexpresando CNNM3 incrementan los niveles de PRL-1/2 lo que se correlaciona con un incremento en el tamaño del tumor respecto del ratón control. Además, en condiciones de bajo contenido intracelular de Mg^{2+} las células sobreexpresan PRL-2, que al unirse a CNNM3 promueve la entrada de Mg^{2+} lo que aumenta la concentración intracelular de este catión y hace que el tumor progrese. Funato *et al* obtuvieron un resultado similar donde observaron que ratones a los que se les había inyectado células sobreexpresando el mutante de PRL-3 C49S (que se demostró que no interaccionaba con CNNM4) presentaban menor número y tamaño de tumores en los pulmones que aquellos con PRL-3 *Wt*. En este trabajo, los autores propusieron que la formación del complejo inhibe la extrusión de Mg^{2+} mediada por CNNM4, de tal manera que la concentración intracelular aumenta y permite crecer al tumor. Es decir, pese a la controversia sobre la direccionalidad del Mg^{2+} y del papel de los CNNMs, en ambos estudios la conclusión principal es que la formación del complejo aumenta la concentración intracelular de Mg^{2+} lo que favorece la progresión tumoral. Por el momento, la extrusión de Mg^{2+} mediada por CNNM3, a diferencia de en CNNM2 y CNNM4 nunca ha sido probada¹⁵⁵.

Nuestra estructura del complejo CNNM2_{BAT}-PRL-1 ha desvelado que la interacción entre ambas proteínas provoca modificaciones en ambas. El cambio más drástico lo sufre CNNM2_{BAT}. Esta región parece ser la única de CNNM2 que participa en la interacción con la fosfatasa, y lo hace a través de la elongación que presenta en el motivo CBS2, el “loop” L553-558 que une las láminas $\beta 5$ y $\beta 6$ (Fig 5.3, **A**). Tras unirse a PRL-1, CNNM2_{BAT} sufre un cambio conformacional, que afecta a su auto-ensamblaje, y por tanto a la estructura del disco que resulta de dicha asociación, haciendo que el módulo CBS que forma transite desde una conformación alabeada (“*Twisted*”) a otra aplanada (“*Flat*”), de forma análoga a lo que ocurre cuando CNNM2_{BAT} une MgATP (Fig 4.25, Resultados). En contraste, PRL-1 varía significativamente menos su estructura, limitando sus cambios a la orientación de los loops (P y WPD) que definen la entrada de su cavidad catalítica, sin afectar a su plegamiento general. La unión de CNNM2, dirige estos loops hacia el interior de la cavidad como cuando se encuentra un sustrato en su interior (Fig.4.27, Resultados). El residuo D558 de CNNM2 se introduce en la cavidad catalítica de PRL-1 y ocupa la posición análoga de un potencial sustrato, lo que explica no solo la reorganización de las regiones que conforman la cavidad catalítica de PRL-1 sino también el descenso de la actividad fosfatasa tras la unión del CNNM (Fig 5.3, **A**, Fig 4.28, Resultados). La superposición de PRL-1 con las estructuras de otras fosfatasas sugiere que, a pesar de ser considerada una fosfatasa dual, PRL-1 es

Discusión

probablemente una serina-treonina fosfatasa de baja actividad, y no una tirosina fosfatasa, ya que la presencia de residuos voluminosos impediría estéricamente la interacción con alguna proteína bien identificada como CNNM2. Este resultado es apoyado por un estudio que demuestra que la presencia de fosfo-cisteínas en la cavidad catalítica de PRL-2 inhibe la formación del complejo con el módulo Bateman de CNNM3^{276,281}. Además, la baja actividad in vitro de las PRLs también se explica por la falta de residuos catalíticos que son cruciales para la función de las fosfatasas de alta actividad como PTEN¹⁵⁸. Por ejemplo, PRL-1 contiene una alanina (en lugar de un residuo que contenga un hidroxilo) junto a la arginina catalítica 110²⁸². Nuestros datos apoyan estudios recientes que proponen que el papel principal de las PRLs no es la desfosforilación de sustratos, sino el control del transporte de Mg^{2+} a través de su interacción los CNNMs^{158,160}.

La estructura del complejo CNNM2_{BAT}-PRL-1 que presentamos en esta tesis, plantea la cuestión de si la unión de PRL-1 afecta y/o determina la afinidad de la interacción entre CNNM2 y el MgATP. El cambio conformacional que sufre CNNM2_{BAT} tras la unión de PRL-1 es el mismo que se produce cuando se une MgATP en el sitio S2, y sugiere que la unión de PRL-1 a CNNM2 predisponga su cavidad S2 para la acomodación del MgATP (incrementando la afinidad de CNNM2 por este nucleótido). En nuestra opinión, no parece probable que la unión de MgATP a CNNM2 incremente la afinidad por PRL-1, ya que la unión de MgATP a CNNM2 no afecta a la orientación del “loop” L553-558, a través del cual se unen CNNM2_{BAT} y PRL-1. Estudios previos habían propuesto que la unidad funcional de PRL-1 es un trímero^{268,283}. En contraste con esta hipótesis, nuestros datos muestran que la formación de un trímero estable impediría estéricamente la formación del complejo CNNM2_{BAT}-PRL-1. Alternativamente, no podemos descartar que la formación del complejo CNNM-PRL implique mecánicamente un desensamblaje previo o concomitante de un trímero de PRL-1.

Hasta la fecha, solo se han descrito un número pequeño de proteínas que interaccionan con PRL-1. Entre ellas están CNNM2, CNNM3¹⁵⁸ y CNNM4¹⁶⁰, el dominio homólogo 3 a Src (SH3) de la proteína activadora Rho-GTPasa p115 (RhoGAP), la cual es un inhibidor de RhoA²⁸⁴, el factor de transcripción nuclear P53²⁸⁵, el factor activador de transcripción 5 (ATF-5) y la tubulina²⁸⁶. Sin embargo, el conocimiento estructural se limita a la estructura de PRL-1 unida a un péptido de alta identidad de secuencia con un motivo conservado del dominio SH3 de RhoGAP p115²⁸⁴ (Código PDB 3RZ2) que como se muestra en la Figura 5.3, **(B)**, ocurre en un sitio diferente que la unión de CNNM2 a PRL-1²⁸⁴.

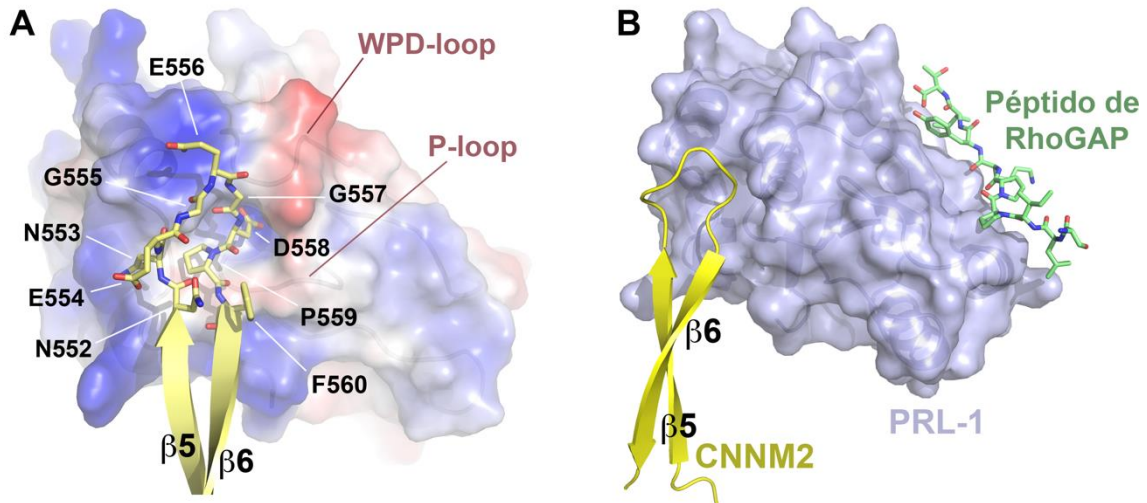


Figura 5.3. Proteínas que interactúan con PRL-1. (A) representación de la superficie molecular y el potencial electrostático de la región de interacción de PRL-1 con CNNM2. Residuos cargados positiva y negativamente se representan en azul y rojo respectivamente. Residuos G555, G557 y P559 en el "loop" L553-558 proporcionan a la cadena principal de CNNM2 la flexibilidad suficiente para orientar los residuos E554, E556 y D558 hacia las áreas de carga positiva de PRL-s. El residuo D558 de CNNM2 se introduce en la cavidad catalítica de PRL-1 entre los WPD- y P-loops. (B) Representación de la superficie molecular de la región de interacción entre PRL-1 (azul), CNNM2 (amarillo) y el péptido con homología al dominio SH3 de RhoGAP (verde).

Estructura tridimensional de la región intracelular de los CNNMs.

El trabajo presentado en esta tesis muestra la estructura general de la región intracelular completa de CNNM4 humano, en presencia y en ausencia de la fosfatasa PRL-1 y de los ligandos (MgATP) (Fig 5.4.). Nuestro estudio aporta nuevos datos estructurales que pueden ayudar a comprender la regulación del transporte de Mg^{2+} mediado por estas proteínas a través de la unión a MgATP y a las PRLs. También hemos demostrado que el dominio cNMP es en realidad un dominio homólogo a un dominio de unión a cNMPs y es incapaz de unir nucleótidos cíclicos. Ambos dominios intracelulares dimerizan de forma independiente y a su vez contribuyen a la dimerización general de la proteína. Sin embargo, mientras que el módulo Bateman es conformacionalmente flexible, el dominio cNMP es más rígido y delimita morfológicamente el cambio conformacional sufrido en el módulo CBS tras la unión de sus ligandos (Fig 5.4.). Nuestros datos muestran que la unión de PRL-1 no afecta a la orientación del dominio cNMP, y confirman que éste no interactúa directamente con la fosfatasa. (Fig 4.32, Resultados).

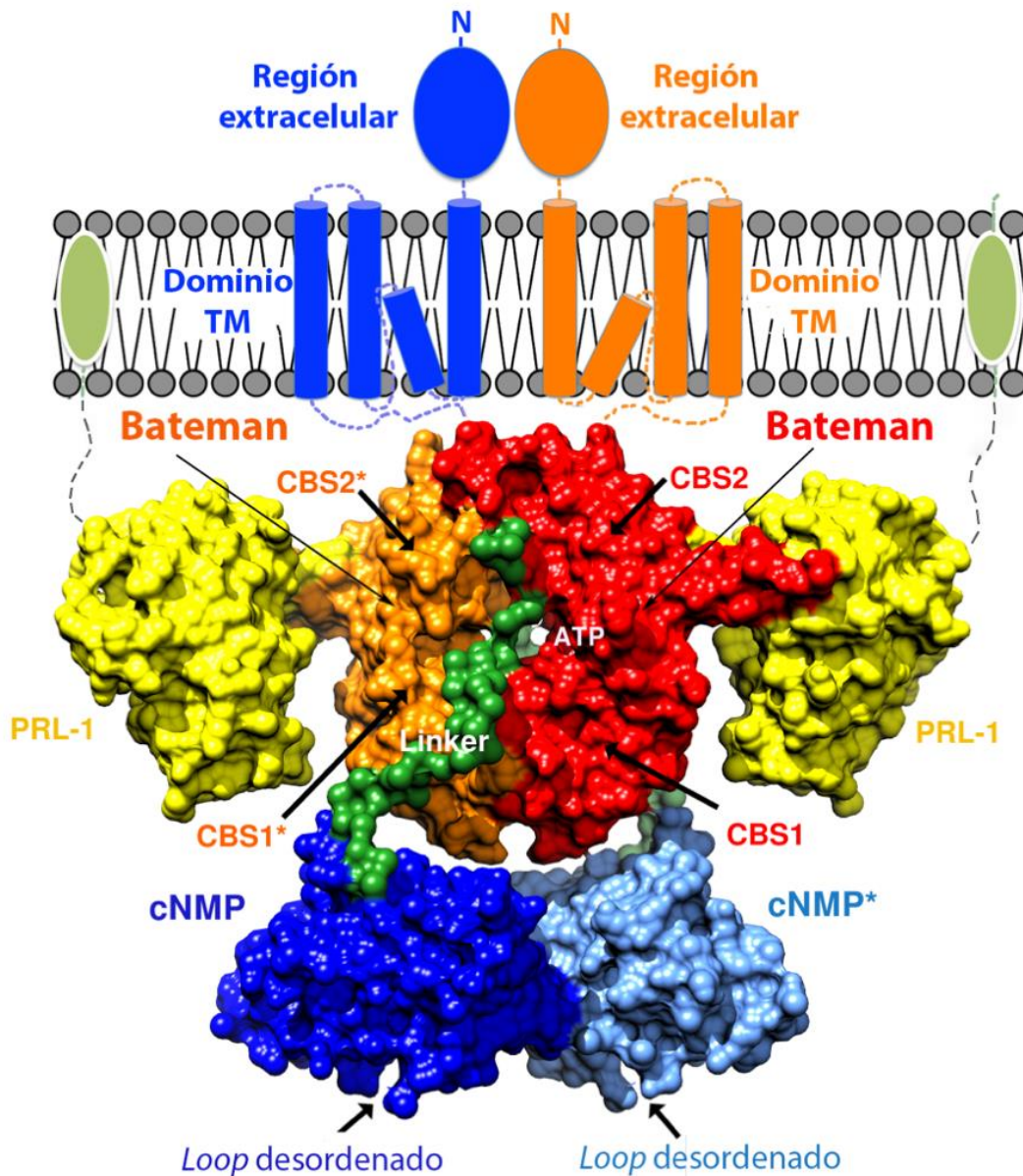


Figura 5.4. Representación de la estructura del complejo CNNM4^{BAT}-cNMP-Ctail-PRL-1. Los módulos Bateman de subunidades complementarias de CNNM4 se representan en rojo y naranja respectivamente. Las subunidades del dímero del dominio cNMP se representa en azul oscuro y claro, y las moléculas de PRL-1 en amarillo. La región de conexión se representa en color verde. La membrana plasmática se representa en color gris y los dominios DUF21 y extracelulares de moléculas de CNNM4 complementarios en azul y naranja respectivamente. El sitio de prenilación a la membrana plasmática de PRL-1 se representa como una esfera verde claro.

Mecanismo de transporte de Mg²⁺ mediado por los factores homeostáticos CNNM

Como mencionamos al comienzo de la memoria, la función concreta de los factores homeostáticos del Mg²⁺ CNNM, todavía tiene que elucidarse. Sin embargo, a pesar de la controversia generada sobre si son transportadores directos o sobre si regulan el transporte de Mg²⁺ a través de una proteína aún por identificar, su implicación en la regulación del transporte de Mg²⁺ en células eucariotas es indudable, y se encuentra

Discusión

apoyada por diversos trabajos publicados en los últimos años^{156,160,177,186,200,202,205,287}. Además, con la aparición de su *partner* molecular, las fosfatasa de la familia PRL, el transporte de Mg^{2+} mediado por los CNNMs alcanzó una nueva dimensión al estar implicado también en el desarrollo tumoral. Tremblay y Miki demostraron de forma independiente que la formación del complejo CNNM-PRL se traduce en un incremento de la concentración intracelular de Mg^{2+} que es utilizado por la célula tumoral para crecer y migrar^{160,178}. Toda esta información, lejos de aclarar, complica la comprensión del mecanismo por el cual los CNNMs, en conjunto o no con las PRLs median el transporte de Mg^{2+} . A modo de resumen, las conclusiones que no están sujetas a debate de entre los diferentes estudios publicados sobre los CNNMs son:

(1) CNNM2 y CNNM4 se expresan en la membrana basolateral de células epiteliales,

(2) CNNM2 y CNNM4 unen MgATP con baja afinidad, y la unión del ATP depende de la presencia de Mg^{2+} ,

(3) la unión de MgATP provoca un cambio conformacional en el módulo Bateman, y por consiguiente en el módulo CBS que forma al autoensamblarse. Este cambio estructural afecta a las hélices H0 que unen el módulo Bateman al dominio DUF21, y probablemente a la regulación del transporte de Mg^{2+} a través de la membrana celular,

(4) la mutación T568I presente en pacientes con hipomagnesemia previene la unión de MgATP y bloquea el módulo CBS en su conformación plana de forma irreversible y permanente,

(5) la unión de las PRLs a los CNNMs provoca el mismo cambio conformacional que la unión de MgATP,

(6) la formación del complejo CNNM-PRL conlleva un aumento de los niveles intracelulares de Mg^{2+} que se relacionan con la progresión tumoral y

(7) las PRLs se sobreexpresan en condiciones de depleción de Mg^{2+} en la célula.

Por otro lado, pese a que está demostrado que los CNNMs con proteínas implicadas en la homeostasis del Mg^{2+} en células de mamífero, se desconoce si son transportadores directos o regulan el transporte de Mg^{2+} a través de otra proteína aún por identificar. Desde un punto de vista estructural no es posible asignar de forma inequívoca la función de los CNNMs, pero si se pueden aportar características que

Discusión

apoyan o descartan hipótesis previas. Entre las propiedades estructurales que apoyan el transporte directo están:

(1) la presencia de un dominio transmembranoso que sería potencialmente capaz de transportar iones metálicos a través de la membrana,

(2) la presencia de un dominio Bateman regulador directamente conectado a la región transmembrana de forma similar a canales como MgtE, o la familia de canales de Cl⁻ CLC,

(3) la capacidad de unión de ATP y Mg²⁺ y los cambios conformacionales asociados a su unión apunta en la dirección de mecanismos de transporte similares a los descritos en otros canales,

(4) la presencia de un dominio C-terminal CNBH, el cual, si es eliminado inhibe la extrusión de Mg²⁺.

(5) el papel estructural de la mutación causante de hipomagnesemia T568I en CNNM2 que impide la extrusión de Mg²⁺ en el DCT y

(6) A pesar de grandes esfuerzos experimentales, no se ha identificado ningún transportador que interactúe con los CNNMs y posicione a este último como un simple modulador de su actividad.

Entre las características que no apoyan el transporte mediado de forma directa a través de los CNNMs, caben destacar:

(1) el escaso número de sitios de unión a Mg²⁺ presentes en el módulo Bateman, si se compara con otros canales como MgtE,

(2) el moderado número de hélices transmembrana presentes en el dominio DUF21 (entre 3 y 5) en comparación con canales que forman poros o con transportadores que promueven el transporte de iones en contra de gradiente

y (3) el hecho de que la proteína dimerice y no forme estados oligoméricos mayores como el que habitualmente se observa en otros canales y transportadores. Este aspecto es sin embargo controvertido, pues MgtE forma dímeros funcionales.

En conclusión, la información disponible en la bibliografía y los datos presentados en esta tesis, hacen que elaborar un modelo de transporte de Mg²⁺ mediado por los

Discusión

CNNMs e involucrando a las PRLs sea complejo. Para ello habría que conocer inequívocamente factores importantes como la direccionalidad del transporte del catión en distintos tejidos y órganos, y la presencia de las PRLs en células epiteliales, no tumorales que permitiesen unificar mecanismos en distintas poblaciones celulares. No obstante, en base a los nuevos datos estructurales que hemos obtenido, postulamos los siguientes mecanismos en células epiteliales y en células tumorales:

Mecanismo de transporte transcelular en el DCT y el enterocito: En las células epiteliales, CNNM2 y CNNM4 se sobreexpresan y localizan en la membrana basolateral (en contacto con los capilares sanguíneos)^{156,202}.

- (i) La célula epitelial incorpora Mg^{2+} a través de los canales localizados en la región apical, TRPM6 y TRPM7^{21,23}, haciendo que la concentración intracelular de Mg^{2+} aumente progresivamente.
- (ii) Al aumentar la concentración de Mg^{2+} , se favorece la síntesis de ATP, y por consiguiente aumentan también los niveles de MgATP⁹⁷.
- (iii) Cuando se alcanza cierto umbral de concentración intracelular (en el rango milimolar), el MgATP se une al módulo Bateman del CNNM y provoca un cambio conformacional “*twisted-to-flat*” del módulo CBS que se transmite al dominio transmembranoso DUF21 a través de las hélices H0. Este cambio conformacional es simétrico, y así se transmite a la región transmembranosa, favoreciendo la extrusión del Mg^{2+} a través de la misma.
- (iv) Cuando la concentración intracelular de Mg^{2+} disminuye tras la extrusión, el ATP disminuye su afinidad por la proteína y abandona la cavidad S2, haciendo que el módulo CBS retorne a su conformación alabeada, frenando concomitantemente el transporte.

Mecanismo de transporte en la célula tumoral: El alto consumo de energía (ATP) que requiere la célula tumoral se traduce en una disminución de la concentración de ATP intracelular, que requiere su renovación para asegurar la supervivencia. Postulamos que el mecanismo que facilita dicho proceso sería el siguiente

- (i) El descenso en la concentración de ATP (o de MgATP en su forma funcional), provoca una disminución en la concentración de Mg^{2+} intracelular que induce la expresión de las fosfatasas PRL¹⁷⁸.
- (ii) Las PRLs se unen al módulo Bateman de los CNNMs formando un complejo estable, e inducen el cambio conformacional “*twisted-to-flat*” del módulo CBS.

Discusión

- (iii) El cambio conformacional del módulo CBS del CNNM inhibe la extrusión de Mg^{2+} , disminuyendo la flexibilidad conformacional del CNNM. Esta inhibición genera una acumulación progresiva del Mg^{2+} intracelular, que sigue accediendo a la célula a través de los canales TRPM6/M7.
- (iv) A medida que la concentración intracelular de Mg^{2+} aumenta, se favorece la síntesis de ATP que proporciona energía al tumor. Mientras la concentración de MgATP es alta, el nucleótido permanece unido al módulo Bateman reforzando el papel inhibitorio de la fosfatasa.
- (v) Cuando la concentración de Mg^{2+} (o MgATP) es suficientemente alta, la fosfatasa deja de expresarse, y por tanto empieza a dejarse de formar el complejo CNNM-PRL.
- (vi) A medida que el tumor consume energía, disminuye la concentración de Mg^{2+} (y de MgATP), y el módulo CBS se desbloquea y adquiere de nuevo la flexibilidad conformacional que le permite retornar a su conformación alabeada (*twisted*), permitiendo de nuevo la extrusión de Mg^{2+} .

Discusión

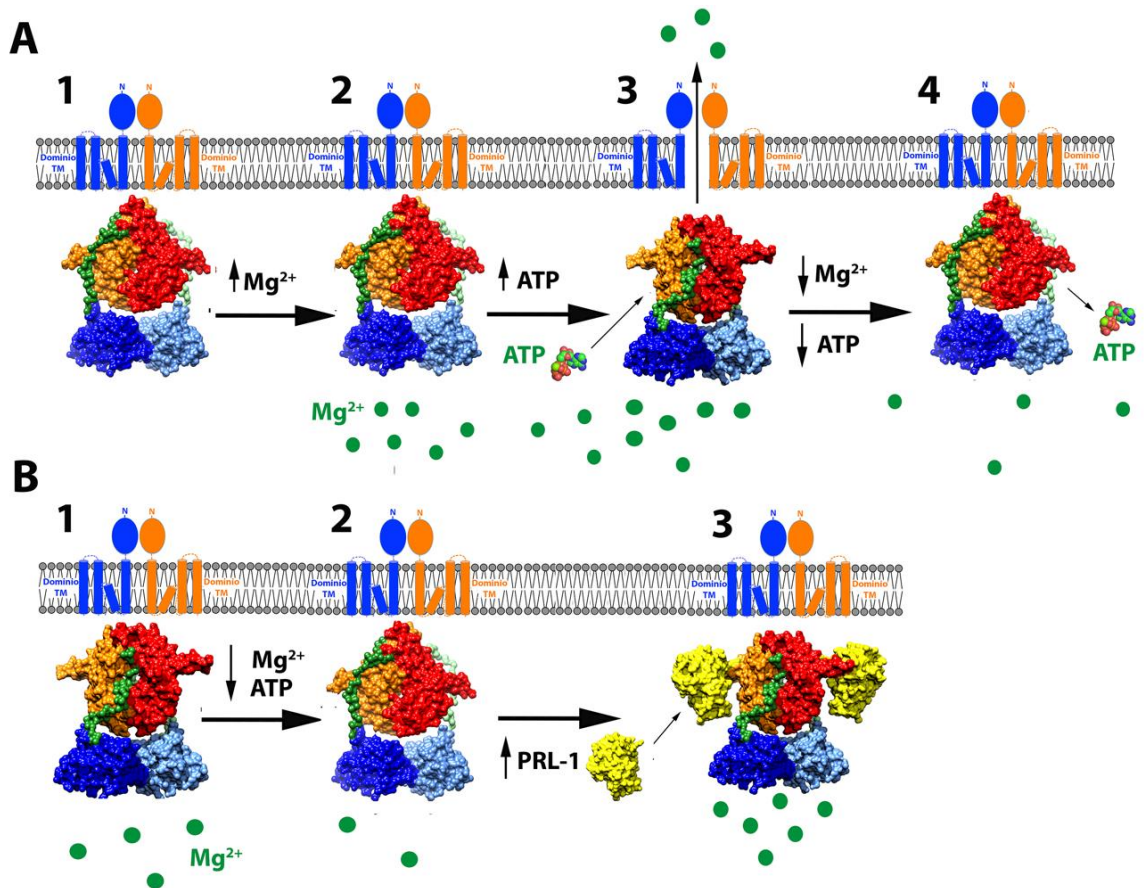


Figura 5.5. Mecanismo de transporte mediado por CNNM4. (A) Modelo del mecanismo de transporte de Mg^{2+} mediado por CNNM4 en la célula epitelial. (1) A baja concentración de Mg^{2+} intracelular, el módulo CBS se encuentra en su conformación “*twisted*” (los módulos CNNM4_{BAT} complementarios están coloreados en naranja y rojo, respectivamente). (2) El aumento de la concentración de Mg^{2+} promueve la síntesis de ATP y su unión al módulo CBS. (3) La unión del ATP induce un cambio conformacional del módulo CBS a la conformación “*flat*”, cuyos límites morfológicos están delineados por el dímero 2xCNNM4_{CNMP} (subunidades en azul oscuro y claro). Este cambio estructural se transmite a la zona transmembranosa de la proteína favoreciendo la extrusión de Mg^{2+} hacia el exterior de la célula. (4) Cuando la concentración intracelular de Mg^{2+} disminuye el MgATP se suelta del módulo CBS, que vuelve a cambiar su conformación a “*twisted*” y se inhibe la extrusión de Mg^{2+} . (B) Modelo del mecanismo de transporte de Mg^{2+} mediado por CNNM4 en la célula tumoral. (1) El consumo de energía (ATP) por parte de la célula tumoral desplaza conformacionalmente el módulo CBS hacia la conformación “*twisted*” (2). Una concentración intracelular baja de Mg^{2+} induce la expresión de PRL-1, y su unión a los módulos Bateman de CNNM4, y la evolución del módulo CBS hacia su conformación “*flat*” (3), que tiene como consecuencia la inhibición de la extrusión de Mg^{2+} .

6. Conclusiones

Conclusiones

1. El módulo Bateman de CNNM4 humano (CNNM4_{BAT}) es estructuralmente equivalente al de CNNM2 y está compuesto por dos dominios cistationina β -sintasa que albergan entre sus láminas β dos cavidades simétricas (S1 y S2).
2. La cavidad S2 une MgATP, y presenta un *cluster* ácido que reduce la afinidad de la cavidad por ATP, e impone una dependencia de Mg²⁺ para unirlo. Este *cluster* está conservado en todos homólogos de los CNNMs y en proteínas bacterianas relacionadas como CorB, CorC y SA0657.
3. CNNM4_{BAT} se autoasocia a través de sus α -hélices formando homodímeros paralelos con forma de disco (*módulos CBS*).
4. En ausencia de ATP, el módulo CBS de CNNM4 presenta una conformación “*semitwisted*” en los cristales, que es intermedia entre la forma “*twisted*” y la “*flat*” que adquiere CNNM2_{BAT} en ausencia y en presencia de MgATP, respectivamente.
5. El dominio cNMP de CNNM4 (CNNM4_{cNMP}) presenta un plegamiento similar al de dominios de unión a nucleótidos cíclicos (CNBDs) de otras proteínas, pero no posee su capacidad de unir nucleótidos cíclicos, como AMPc o GMPc.
6. CNNM4_{cNMP} se autoasocia formando dímeros compactos y elongados que contienen cuatro cavidades en su superficie, simétricas dos a dos.
7. Combinando las estructuras cristalinas de CNNM4_{BAT} y CNNM4_{cNMP} con datos SAXS en solución, hemos elucidado la estructura tridimensional de la región intracelular completa de CNNM4.
8. El dímero 2xCNNM4_{cNMP}, presenta una cavidad que delinea los límites morfológicos del cambio conformacional “*twisted-to-flat*” que sufre el módulo CBS de los CNNMs al unir MgATP.
9. El módulo Bateman de CNNM2 (CNNM2_{BAT}) forma complejos estables con las tres fosfatasa de la familia PRL.

Conclusiones

10. El complejo CNNM₂^{BAT}·PRL-1 es un heterotetrámero formado por un módulo CBS plano de CNNM₂ y dos moléculas independientes de PRL-1 situadas a cada extremo del disco. La interacción entre CNNM₂^{BAT} y PRL-1 tiene lugar a través del “*loop*” largo (L553-558) del motivo CBS2 de CNNM₂^{BAT} y la cavidad catalítica de PRL-1.
11. La unión de PRL-1 a CNNM₂^{BAT} induce un cambio conformacional en el módulo CBS de CNNM₂, desde una conformación “*twisted*” a una conformación “*flat*” similar a la que adopta al unir MgATP.
12. La interacción con CNNM₂^{BAT} inhibe la actividad fosfatasa de PRL-1.
13. El dominio CNNM₁^{CNMP} no interactúa directamente con la fosfatasa PRL-1 ni afecta a la conformación del complejo CNNM₂^{BAT}·PRL-1.
14. Los datos presentados en esta tesis, incrementan el conocimiento estructural de los factores homeostáticos CNNM que subyacen en el transporte de Mg²⁺ mediado por los CNNMs y su interacción con las fosfatasas PRLs en mamíferos.

7. Bibliografía

Bibliografía

1. El-Samad, H., Goff, J. P. & Khammash, M. Calcium homeostasis and parturient hypocalcemia: An integral feedback perspective. *J. Theor. Biol.* **214**, 17–29 (2002).
2. Merino, J. Noriega, M. J. Transporte a traves de la membrana. *Open course ware* 390–391 (2016).
3. Dubyak, G. R. Ion homeostasis, channels, and transporters: an update on cellular mechanisms. *Adv. Physiol. Educ.* **28**, 143–154 (2004).
4. Clay, J. R. Axonal excitability revisited. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **88**, 59–90 (2005).
5. Montini, G., Booker, J., Sula, A. & Wallace, B. A. Comparisons of voltage-gated sodium channel structures with open and closed gates and implications for state-dependent drug design. *Biochem. Soc. Trans.* **46**, 1567–1575 (2018).
6. Lolicato, M. *et al.* Tetramerization dynamics of C-terminal domain underlies isoform-specific cAMP gating in hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. *J. Biol. Chem.* **286**, 44811–44820 (2011).
7. Roux, B. Ion channels and ion selectivity. *Essays Biochem.* **61**, 201–209 (2017).
8. James, Z. M. & Zagotta, W. N. Structural insights into the mechanisms of CNBD channel function. *J. Gen. Physiol.* **150**, 225–244 (2017).
9. Arcangeletti, M. *et al.* The gating mechanism in cyclic nucleotide-gated ion channels. *Sci. Rep.* **8**, 1–15 (2018).
10. Alpizar, S. A., Cho, I. H. & Hoppa, M. B. Subcellular control of membrane excitability in the axon. *Curr. Opin. Neurobiol.* **57**, 117–125 (2019).
11. Payandeh, J., Pfoh, R. & Pai, E. F. The structure and regulation of magnesium selective ion channels. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1828**, 2778–2792 (2013).
12. Chen-Izu, Y. *et al.* Na⁺ channel function, regulation, structure, trafficking and sequestration. *J. Physiol.* **593**, 1347–1360 (2015).
13. Unwin, N. The structure of ion channels in membranes of excitable cells. *Neuron* **3**, 665–676 (1989).
14. Pivovarov, A. S., Calahorra, F. & Walker, R. J. Na⁺ /K⁺ -pump and neurotransmitter membrane receptors. *Invertebr. Neurosci.* **19**, 1–16 (2019).
15. Artigas, P. & Gadsby, D. C. Na⁺/K⁺-pump ligands modulate gating of palytoxin-induced ion channels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 501–505 (2003).
16. Whisenant, N. Regulatory interaction of ATP Na⁺ and Cl⁻ in the turnover cycle of the NaK2Cl cotransporter. *J. Gen. Physiol.* **101**, 889–908 (1993).
17. Padan, E. & Landau, M. *The Alkali Metal Ions: Their Role for Life.* **16**, (2016).
18. Jahnen-Dechent, W. & Ketteler, M. Magnesium basics. *CKJ Clin. Kidney J.* **5**,

Bibliografia

- (2012).
19. Maguire, M. E. & Cowan, J. A. Magnesium chemistry and biochemistry. *BioMetals* **15**, 203–210 (2002).
 20. Saris, N. L., Mervaala, E., Karppanen, H., Khawaja, J. A. & Lewenstam, A. Magnesium. An update on physiological, clinical and analytical aspects. *Clin. Chim. Acta* **294**, 1–26 (2000).
 21. de Baaij, J. H. F., Hoenderop, J. G. J. & Bindels, R. J. M. Magnesium in Man: Implications for Health and Disease. *Physiol. Rev.* **95**, 1–46 (2015).
 22. Moncrief, M. B. C. & Maguire, M. E. Magnesium transport in prokaryotes. *J. Biol. Inorg. Chem.* **4**, 523–527 (1999).
 23. Schäffers, O. J. M., Hoenderop, J. G. J., Bindels, R. J. M. & de Baaij, J. H. F. The rise and fall of novel renal magnesium transporters. *Am. J. Physiol. Physiol.* **314**, F1027–F1033 (2018).
 24. Quamme, G. A. Molecular identification of ancient and modern mammalian magnesium transporters. *Am. J. Physiol. Physiol.* **298**, C407–C429 (2009).
 25. Maguire, M. E. & Papp-Wallace, K. M. Magnesium Transport and Magnesium Homeostasis. *EcoSal Plus* **3**, (2014).
 26. Schäffers, O. J. M., Hoenderop, J. G. J., Bindels, R. J. M. & de Baaij, J. H. F. The rise and fall of novel renal magnesium transporters. *Am. J. Physiol. Physiol.* **314**, F1027–F1033 (2018).
 27. de Baaij, J. H. F. The art of magnesium transport. *Magnes. Res.* **28**, 85–91 (2015).
 28. Mastrototaro, L., Smorodchenko, A., Aschenbach, J. R., Kolisek, M. & Sponder, G. Solute carrier 41A3 encodes for a mitochondrial Mg²⁺ efflux system. *Sci. Rep.* **6**, 1–14 (2016).
 29. Kolisek, M. *et al.* Mrs2p is an essential component of the major electrophoretic Mg²⁺ influx system in mitochondria. *EMBO J.* **22**, 1235–1244 (2003).
 30. Groisman, E. A. *et al.* Bacterial Mg²⁺ Homeostasis, Transport, and Virulence. *Annu. Rev. Genet.* **47**, 625–646 (2013).
 31. Thomas, K. J. & Rice, C. V. Revised model of calcium and magnesium binding to the bacterial cell wall. *BioMetals* **27**, 1361–1370 (2014).
 32. Oyston, P. C. F. *et al.* The response regulator PhoP is important for survival under conditions of macrophage-induced stress and virulence in *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* **68**, 3419–3425 (2000).
 33. Moss, J. E., Fisher, P. E., Vick, B., Groisman, E. A. & Zychlinsky, A. The regulatory protein PhoP controls susceptibility to the host inflammatory response in *Shigella flexneri*. *Cell. Microbiol.* **2**, 443–452 (2000).

Bibliografia

34. Gellatly, S. L., Needham, B., Madera, L., Trent, M. S. & Hancock, R. E. W. The *Pseudomonas aeruginosa* PhoP-PhoQ Two-Component Regulatory System Is Induced upon Interaction with Epithelial Cells and Controls Cytotoxicity and Inflammation. *Infect. Immun.* **80**, 3122–3131 (2012).
35. Yeom, J., Pontes, M. H., Choi, J. & Groisman, E. A. A protein that controls the onset of a *Salmonella* virulence program. *EMBO J.* **37**, e96977 (2018).
36. Flego, D. *et al.* A Two-Component Regulatory System, *pehR-pehS*, Controls Endopolygalacturonase Production and Virulence in the Plant Pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**, 447–455 (2000).
37. Gibson, M. M., Bagga, D. A., Miller, C. G. & Maguire, M. E. Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: the influence of new mutations conferring Co^{2+} resistance on the *CorA* Mg^{2+} transport system. *Mol. Microbiol.* **5**, 2753–2762 (1991).
38. Maguire, M. E. *MgtA* and *MgtB*: Prokaryotic P-type ATPases that mediate Mg^{2+} influx. *J. Bioenerg. Biomembr.* **24**, 319–328 (1992).
39. Townsend, D. E. *et al.* Cloning of the *mgtE* Mg^{2+} transporter from *Providencia stuartii* and the distribution of *mgtE* in gram-negative and gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* **177**, 5350–5354 (1995).
40. Armitano, J., Redder, P., Guimarães, V. A. & Linder, P. An essential factor for high mg^{2+} tolerance of *Staphylococcus aureus*. *Front. Microbiol.* **7**, 1–12 (2016).
41. Nelson, Eugene P. Kennedy, D. L. Magnesium transport in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **58**, 77–86 (1971).
42. Park, M. H., Wong, B. B. & Lusk, J. E. Mutants in three genes affecting transport of magnesium in *Escherichia coli*: genetics and physiology. *J. Bacteriol.* **126**, 1096–1103 (1976).
43. Nelson, D. L. & Kennedy, E. P. Transport of Magnesium by a Repressible and a Nonrepressible System in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **69**, 1091–1093 (1972).
44. Smith, R. L. & Maguire, M. E. Distribution of the *CorA* Mg^{2+} transport system in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **177**, 1638–1640 (1995).
45. Nordin, N. *et al.* Exploring the structure and function of *Thermotoga maritima* *CorA* reveals the mechanism of gating and ion selectivity in Co^{2+} / Mg^{2+} transport. *Biochem. J.* **452**, 367–368 (2015).
46. Eshaghi, S. *et al.* Crystal structure of a divalent metal ion transporter *CorA* at 2.9 angstrom resolution. *Science (80-.).* **313**, 354–357 (2006).
47. Payandeh, J. & Pai, E. F. A structural basis for Mg^{2+} homeostasis and the *CorA* translocation cycle. *EMBO J.* **25**, 3762–3773 (2006).

Bibliografía

48. Matthies, D. *et al.* Cryo-EM Structures of the Magnesium Channel CorA Reveal Symmetry Break upon Gating. *Cell* **164**, 747–756 (2016).
49. Cleverley, R. M. *et al.* The Cryo-EM structure of the CorA channel from *Methanocaldococcus jannaschii* in low magnesium conditions. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1848**, 2206–2215 (2015).
50. Lerche, M., Sandhu, H., Flöckner, L., Högbom, M. & Rapp, M. Structure and Cooperativity of the Cytosolic Domain of the CorA Mg²⁺ Channel from *Escherichia coli*. *Structure* **25**, 1175-1186.e4 (2017).
51. Wang, D.-C. *et al.* The C2'- and C3'-endo equilibrium for AMP molecules bound in the cystathionine-beta-synthase domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **497**, 646–651 (2018).
52. Zhang, N., Zhang, S. & Szostak, J. W. Activated ribonucleotides undergo a sugar pucker switch upon binding to a single-stranded RNA template. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 3691–3694 (2012).
53. Zhang, N., Ren, X., Zhu, D., Li, D. & Wang, D. Crystallization and preliminary crystallographic studies of CorC, a magnesium-ion transporter. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **66**, 681–683 (2010).
54. Cui, X. & Xie, Z. Protein interaction and Na/K-ATPase-mediated signal transduction. *Molecules* **22**, (2017).
55. MAGUIRE, M. E. *et al.* Mg²⁺ Transporting P-type ATPases of *Salmonella typhimurium* Wrong Way, Wrong Place Enzymes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **671**, 244–256 (1992).
56. Groisman, E. A. The ins and outs of virulence gene expression: Mg²⁺ as a regulatory signal. *BioEssays* **20**, 96–101 (1998).
57. Miller, S. I., Kukral, A. M. & Mekalanos, J. J. A two-component regulatory system (phoP phoQ) controls *Salmonella typhimurium* virulence (gene regulation/pathogenesis/macrophage survival). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 5054–5058 (1989).
58. Bourret, T. J., Liu, L., Shaw, J. A., Husain, M. & Vázquez-Torres, A. Magnesium homeostasis protects *Salmonella* against nitrooxidative stress. *Sci. Rep.* **7**, 1–11 (2017).
59. Miyashiro, T. & Goulian, M. Stimulus-dependent differential regulation in the *Escherichia coli* PhoQ PhoP system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 16305–16310 (2007).
60. Smith, R. L., Thompson, L. J. & Maguire, M. E. Cloning and characterization of MgtE, a putative new class of Mg²⁺ transporter from *Bacillus firmus* OF4. *J. Bacteriol.* **177**, 1233–1238 (1995).

Bibliografía

61. Hattori, M. *et al.* Mg²⁺-dependent gating of bacterial MgtE channel underlies Mg²⁺ homeostasis. *EMBO J.* **28**, 3602–3612 (2009).
62. Shimada, I. *et al.* ATP-dependent modulation of MgtE in Mg²⁺ homeostasis. *Nat. Commun.* **8**, 1–11 (2017).
63. Ishitani, R. *et al.* Mg²⁺-sensing mechanism of Mg²⁺ transporter MgtE. *Pnas* **105**, 4–6 (2008).
64. Pallen, M. & Gophna, U. Bacterial flagella and type III secretion: Case studies in the evolution of complexity. *Genome Dyn.* **3**, 30–47 (2007).
65. Baykov, A. A., Tuominen, H. K. & Lahti, R. The CBS Domain : A Protein Module with an Emerging Prominent Role in Regulation. 1156–1163 (2011).
66. Mahmood, N. A. B. N., Biemans-Oldehinkel, E. & Poolman, B. Engineering of ion sensing by the cystathionine β -synthase module of the ABC transporter OpuA. *J. Biol. Chem.* **284**, 14368–14376 (2009).
67. Ereño-Orbea, J., Oyenarte, I. & Martínez-Cruz, L. A. CBS domains: Ligand binding sites and conformational variability. *Arch. Biochem. Biophys.* **540**, 70–81 (2013).
68. Hattori, M., Tanaka, Y., Fukai, S., Ishitani, R. & Nureki, O. Crystal structure of the MgtE Mg²⁺ transporter. *Nature* **448**, 1072–1075 (2007).
69. Tomita, A. *et al.* ATP-dependent modulation of MgtE in Mg²⁺ homeostasis. *Nat. Commun.* **8**, 1–11 (2017).
70. Ignoul, S. & Eggermont, J. CBS domains: structure, function, and pathology in human proteins. *Am. J. Physiol. Physiol.* **289**, C1369–C1378 (2005).
71. Cebrián, G., Arroyo, C., Mañas, P. & Condón, S. Bacterial maximum non-inhibitory and minimum inhibitory concentrations of different water activity depressing solutes. *Int. J. Food Microbiol.* **188**, 67–74 (2014).
72. Myers, E. W. *et al.* A whole-genome assembly of *Drosophila*. *Science (80-)*. **287**, 2196–2204 (2000).
73. Meyer, S., Savaresi, S., Forster, I. C. & Dutzler, R. Nucleotide recognition by the cytoplasmic domain of the human chloride transporter CIC-5. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 60–67 (2007).
74. Cowan, J.A. Structural and catalytic chemistry of magnesium-dependent enzymes. *BioMetals* **15**, 225–235 (2002).
75. Shaul, O. Magnesium transport and function in plants: the tip of the iceberg. *BioMetals* **15**, 309–323 (2002).
76. Chen, Z. C., Peng, W. T., Li, J. & Liao, H. Functional dissection and transport mechanism of magnesium in plants. *Semin. Cell Dev. Biol.* **74**, 142–152 (2018).
77. Verbruggen, N. & Hermans, C. Physiological and molecular responses to

Bibliografia

- magnesium nutritional imbalance in plants. *Plant Soil* **368**, 87–99 (2013).
78. Ishijima, S., Uchibori, A., Takagi, H., Maki, R. & Ohnishi, M. Light-induced increase in free Mg²⁺ concentration in spinach chloroplasts: Measurement of free Mg²⁺ by using a fluorescent probe and necessity of stromal alkalinization. *Arch. Biochem. Biophys.* **412**, 126–132 (2003).
 79. Gout, E., Rebeille, F., Douce, R. & Bligny, R. Interplay of Mg²⁺, ADP, and ATP in the cytosol and mitochondria: Unravelling the role of Mg²⁺ in cell respiration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, E4560–E4567 (2014).
 80. IGAMBERDIEV, A. U. & KLECZKOWSKI, L. A. Implications of adenylate kinase-governed equilibrium of adenylates on contents of free magnesium in plant cells and compartments. *Biochem. J.* **360**, 225–231 (2001).
 81. Gebert, M. *et al.* A Root-Expressed Magnesium Transporter of the MRS2/MGT Gene Family in *Arabidopsis thaliana* Allows for Growth in Low-Mg²⁺ Environments. *Plant Cell* **21**, 4018–4030 (2009).
 82. Chen, Z. C., Yamaji, N., Motoyama, R., Nagamura, Y. & Ma, J. F. Up-Regulation of a Magnesium Transporter Gene OsMGT1 Is Required for Conferring Aluminum Tolerance in Rice. *Plant Physiol.* **159**, 1624–1633 (2012).
 83. Bose, J., Babourina, O. & Rengel, Z. Role of magnesium in alleviation of aluminium toxicity in plants. *J. Exp. Bot.* **62**, 2251–2264 (2011).
 84. Jin, J. *et al.* The channel kinase, TRPM7, is required for early embryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, E225–E233 (2011).
 85. Chen, Z. C. *et al.* A Magnesium Transporter OsMGT1 Plays a Critical Role in Salt Tolerance in Rice. *Plant Physiol.* **174**, 1837–1849 (2017).
 86. Yan, Y.-W. *et al.* Magnesium Transporter MGT6 Plays an Essential Role in Maintaining Magnesium Homeostasis and Regulating High Magnesium Tolerance in *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.* **9**, 1–13 (2018).
 87. Knoop, V., Groth-Malonek, M., Gebert, M., Eifler, K. & Weyand, K. Transport of magnesium and other divalent cations: Evolution of the 2-TM-GxN proteins in the MIT superfamily. *Mol. Genet. Genomics* **274**, 205–216 (2005).
 88. Guo, K. M., Babourina, O., Christopher, D. A., Borsic, T. & Rengel, Z. The cyclic nucleotide-gated channel AtCNGC10 transports Ca²⁺ and Mg²⁺ in *Arabidopsis*. *Physiol. Plant.* **139**, 303–312 (2010).
 89. Lee, J. M. & Gardner, R. C. Residues of the yeast ALR1 protein that are critical for magnesium uptake. *Curr. Genet.* **49**, 7–20 (2006).
 90. Lim, P. H. *et al.* Regulation of *alr1* mg transporter activity by intracellular magnesium. *PLoS One* **6**, (2011).
 91. Graschopf, A. *et al.* The Yeast Plasma Membrane Protein Alr1 Controls Mg²⁺

Bibliografía

- Homeostasis and is Subject to Mg²⁺-dependent Control of Its Synthesis and Degradation. *J. Biol. Chem.* **276**, 16216–16222 (2001).
92. Liu, G. J., Martin, D. K., Gardner, R. C. & Ryan, P. R. Large Mg²⁺-dependent currents are associated with the increased expression of ALR1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **213**, 231–237 (2002).
 93. Ebel, H. & Günther, T. Magnesium Metabolism: A Review. *Clin. Chem. Lab. Med.* **18**, 257–270 (1980).
 94. Corre, T. *et al.* Genome-Wide Meta-Analysis Unravels Interactions between Magnesium Homeostasis and Metabolic Phenotypes. *J. Am. Soc. Nephrol.* **29**, 335–348 (2017).
 95. Kass, L., Weekes, J. & Carpenter, L. Effect of magnesium supplementation on blood pressure: A meta-analysis. *Eur. J. Clin. Nutr.* **66**, 411–418 (2012).
 96. Giménez-Mascarell, P., Schirmacher, C. E., Martínez-Cruz, L. A. & Müller, D. Novel Aspects of Renal Magnesium Homeostasis. *Front. Pediatr.* **6**, (2018).
 97. Ban, C., Junop, M. & Yang, W. Transformation of MutL by ATP Binding and Hydrolysis: A Switch in DNA Mismatch Repair MutL have remained elusive for many years. MutL and its homologs have molecular weights rang. *Cell* **97**, 85–97 (1999).
 98. Caspi, R. *et al.* The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. *Nucleic Acids Res.* **40**, 742–753 (2012).
 99. Bairoch, A. The ENZYME database in 2000. *Nucleic Acids Res.* **28**, 304–305 (2002).
 100. Brautigam, C. A. & Steitz, T. A. Structural and functional insights provided by crystal structures of DNA polymerases and their substrate complexes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 54–63 (1998).
 101. Yang, L., Arora, K., Beard, W. A., Wilson, S. H. & Schlick, T. Critical role of magnesium ions in DNA polymerase β 's closing and active site assembly. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 8441–8453 (2004).
 102. Shen, B., Nolan, J. P., Sklar, L. A. & Park, M. S. Essential amino acids for substrate binding and catalysis of human flap endonuclease. *J. Biol. Chem.* **271**, 9173–9176 (1996).
 103. Laughlin, M. R. & Thompson, D. The regulatory role for magnesium in glycolytic flux of the human erythrocyte. *J. Biol. Chem.* **271**, 28977–28983 (1996).
 104. Weber, G., Lea, M. A., Hird Convery, H. J. & Stamm, N. B. Regulation of gluconeogenesis and glycolysis: Studies of mechanisms controlling enzyme activity. *Adv. Enzyme Regul.* **5**, 257–298 (1967).

Bibliografia

105. DRAPER, D. E. & Misra, V. K. On the role of magnesium ions in RNA stability. *Biopolymers* **48**, 113–135 (1998).
106. Razzaque, M. S. Magnesium: Are we consuming enough? *Nutrients* **10**, 1–8 (2018).
107. Glaudemans, B., Knoers, N. V. A. M., Hoenderop, J. G. J. & Bindels, R. J. M. New molecular players facilitating Mg²⁺ reabsorption in the distal convoluted tubule. *Kidney Int.* **77**, 17–22 (2010).
108. Viering, D. H. H. M., de Baaij, J. H. F., Walsh, S. B., Kleta, R. & Bockenhauer, D. Genetic causes of hypomagnesemia, a clinical overview. *Pediatr. Nephrol.* **32**, 1123–1135 (2017).
109. Karbach, U. & Rummel, W. Cellular and paracellular magnesium transport across the terminal ileum of the rat and its interaction with the calcium transport. *Gastroenterology* **98**, 985–992 (1990).
110. Fine, K. D., Santa Ana, C. A., Porter, J. L. & Fordtran, J. S. Intestinal absorption of magnesium from food and supplements. *J. Clin. Invest.* **88**, 396–402 (1991).
111. Lonnerdal, B. Effects of milk and milk components on calcium, magnesium, and trace element absorption during infancy. *Physiol. Rev.* **77**, 643–669 (1997).
112. D. Kerstan; G. A. Quamme. Intestinal Absorption of Magnesium. *Intest. Absorpt. Met. Ions, Trace Elem. Radionuclides* **228**, 193–210 (2002).
113. Rosenkranz, B. Magnesium Transport in the Gastrointestinal Tract. *Front. Biosci.* 666–677 (2000). doi:10.1515/zrph.1955.71.3-4.269
114. Atherton, J. C. Renal physiology. *Brit. J. Anaesth.* **44**, 236–245 (1972).
115. Hoenderop, J. G. J. & Bindels, R. J. M. Epithelial Ca²⁺ and Mg²⁺ Channels in Health and Disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**, 15–26 (2004).
116. Gong, Y. & Hou, J. Claudins in barrier and transport function—the kidney. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **469**, 105–113 (2017).
117. Zihni, C., Balda, M. S. & Matter, K. Signalling at tight junctions during epithelial differentiation and microbial pathogenesis. *J. Cell Sci.* **127**, 3401–3413 (2014).
118. David E. Clapham. TRP channels as cellular sensors. *Nature* **426**, 517–524 (2003).
119. Flockerzi, V. An introduction on TRP channels. *Handb. Exp. Pharmacol.* **179**, 1–19 (2007).
120. W. Runnels, L. TRPM6 and TRPM7: A Multi-TRP-PLIK-Cation of Channel Functions. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **12**, 42–53 (2010).
121. Iordanov, I., Mihályi, C., Tóth, B. & Csanády, L. The proposed channel-enzyme transient receptor potential melastatin 2 does not possess ADP ribose hydrolase activity. *Elife* **5**, 1–20 (2016).

Bibliografia

122. Desai, B. N. *et al.* Cleavage of TRPM7 Releases the Kinase Domain from the Ion Channel and Regulates Its Participation in Fas-Induced Apoptosis. *Dev. Cell* **22**, 1149–1162 (2012).
123. Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Manasian, Y. & Clapham, D. E. The TRPM7 chanzyme is cleaved to release a chromatin-modifying kinase. *Cell* **157**, 1061–1072 (2014).
124. Krapivinsky, G. *et al.* Histone phosphorylation by TRPM6's cleaved kinase attenuates adjacent arginine methylation to regulate gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, E7092–E7100 (2017).
125. Groenestege, W. M. T., Hoenderop, J. G., van den Heuvel, L., Knoers, N. & Bindels, R. J. The Epithelial Mg²⁺ Channel Transient Receptor Potential Melastatin 6 Is Regulated by Dietary Mg²⁺ Content and Estrogens. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**, 1035–1043 (2006).
126. Walder, R. Y. *et al.* Mutation of TPRM6 causes familial hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *Nat. Genet.* **31**, 171–174 (2002).
127. Duan, J. *et al.* Structure of the mammalian TRPM7, a magnesium channel required during embryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**, E8201–E8210 (2018).
128. Gao, Y. & Liao, P. TRPM4 channel and cancer. *Cancer Lett.* **454**, 66–69 (2019).
129. Wabakken, T., Rian, E., Kveine, M. & Aasheim, H. C. The human solute carrier SLC41A1 belongs to a novel eukaryotic subfamily with homology to prokaryotic MgtE Mg²⁺ transporters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **306**, 718–724 (2003).
130. De Baaij, J. H. F. *et al.* Identification of SLC41A3 as a novel player in magnesium homeostasis. *Sci. Rep.* **6**, 1–11 (2016).
131. Kolisek, M., Nestler, A., Vormann, J. & Schweigel-Röntgen, M. Human gene SLC41A1 encodes for the Na⁺/Mg²⁺ exchanger. *Am. J. Physiol. Physiol.* **302**, C318–C326 (2011).
132. Schweigel-Röntgen, M. & Kolisek, M. SLC41 transporters-molecular identification and functional role. *Curr. Top. Membr.* **73**, 383–410 (2014).
133. Li, F. Y. *et al.* Second messenger role for Mg²⁺ revealed by human T-cell immunodeficiency. *Nature* **475**, 471–476 (2011).
134. Monticelli, M., Ferro, T., Jaeken, J., dos Reis Ferreira, V. & Videira, P. A. Immunological aspects of congenital disorders of glycosylation (CDG): a review. *J. Inherit. Metab. Dis.* **39**, 765–780 (2016).
135. Shrimal, S., Cherepanova, N. A. & Gilmore, R. Cotranslational and

Bibliografia

- posttranslocational N-glycosylation of proteins in the endoplasmic reticulum. *Semin. Cell Dev. Biol.* **41**, 71–78 (2015).
136. Duc, M. B., Gregan, J., Jarosch, E., Ragnini, A. & Schweyen, R. J. The bacterial magnesium transporter CorA can functionally substitute for its putative homologue Mrs2p in the yeast inner mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* **274**, 20438–20443 (1999).
137. Piskacek, M., Zotova, L., Zsurka, G. & Schweyen, R. J. Conditional knockdown of hMRS2 results in loss of mitochondrial Mg²⁺ uptake and cell death. *J. Cell. Mol. Med.* **13**, 693–700 (2009).
138. Goytain, A., Hines, R. M., El-Husseini, A. & Quamme, G. A. NIPA1 (SPG6), the basis for autosomal dominant form of hereditary spastic paraplegia, encodes a functional Mg²⁺ transporter. *J. Biol. Chem.* **282**, 8060–8068 (2007).
139. Goytain, A., Hines, R. M. & Quamme, G. A. Functional characterization of NIPA2, a selective Mg²⁺ transporter. *Am. J. Physiol. Physiol.* **295**, C944–C953 (2008).
140. Xie, H. *et al.* Functional study of NIPA2 mutations identified from the patients with childhood absence epilepsy. *PLoS One* **9**, 1–6 (2014).
141. Schultheis, P. J. *et al.* Characterization of the P 5 subfamily of P-type transport ATPases in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **323**, 731–738 (2004).
142. Will, C. *et al.* Targeted deletion of murine Cldn16 identifies extra- and intrarenal compensatory mechanisms of Ca²⁺ and Mg²⁺ wasting. *Am. J. Physiol. Physiol.* **298**, F1152–F1161 (2010).
143. Milatz, S. *et al.* Mosaic expression of claudins in thick ascending limbs of Henle results in spatial separation of paracellular Na⁺ and Mg²⁺ transport. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, E219–E227 (2016).
144. Günzel, D. & Yu, A. S. L. *Claudins and the Modulation of Tight Junction Permeability. Physiological Reviews* **93**, (2013).
145. Reuss, L. Passive Electrical Properties of Toad Urinary Bladder Epithelium: Intercellular Electrical Coupling and Transepithelial Cellular and Shunt Conductances. *J. Gen. Physiol.* **64**, 1–25 (1974).
146. Wilcox, E. R. *et al.* Mutations in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29. *Cell* **104**, 165–172 (2001).
147. Gong, Y. *et al.* Claudin-14 regulates renal Ca²⁺ transport in response to CaSR signalling via a novel microRNA pathway. *EMBO J.* **31**, 1999–2012 (2012).
148. Breiderhoff, T. *et al.* Deletion of claudin-10 (Cldn10) in the thick ascending limb impairs paracellular sodium permeability and leads to hypermagnesemia and nephrocalcinosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 14241–14246 (2012).

Bibliografia

149. Schlingmann, K. P. *et al.* Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia is caused by mutations in TRPM6, a new member of the TRPM gene family. *Nat. Genet.* **31**, 166–170 (2002).
150. Topala, C. N. *et al.* Molecular determinants of permeation through the cation channel TRPM6. *Cell Calcium* **41**, 513–523 (2007).
151. Chubanov, V. *et al.* Epithelial magnesium transport by TRPM6 is essential for prenatal development and adult survival. *Elife* **5**, 1–32 (2016).
152. Schmitz, C. *et al.* Regulation of vertebrate cellular Mg²⁺ homeostasis by TRPM7. *Cell* **114**, 191–200 (2003).
153. Wang, C. Y. *et al.* Molecular cloning and characterization of a novel gene family of four ancient conserved domain proteins (ACDP). *Gene* **306**, 37–44 (2003).
154. YANG, M., JENSEN, L. T., GARDNER, A. J. & CULOTTA, V. C. Manganese toxicity and *Saccharomyces cerevisiae* Mam3p, a member of the ACDP (ancient conserved domain protein) family. *Biochem. J.* **386**, 479–487 (2005).
155. Hirata, Y., Funato, Y., Takano, Y. & Miki, H. Mg²⁺-dependent interactions of ATP with the cystathionine- β -synthase (CBS) domains of a magnesium transporter. *J. Biol. Chem.* **289**, 14731–14739 (2014).
156. Stuijver, M. *et al.* CNNM2, Encoding a Basolateral Protein Required for Renal Mg²⁺ Handling, Is Mutated in Dominant Hypomagnesemia. 333–343 (2011). doi:10.1016/j.ajhg.2011.02.005
157. Arjona, F. J. *et al.* CNNM2 Mutations Cause Impaired Brain Development and Seizures in Patients with Hypomagnesemia. *PLoS Genet.* **10**, (2014).
158. Hardy, S. *et al.* The protein tyrosine phosphatase PRL-2 interacts with the magnesium transporter CNNM3 to promote oncogenesis. *Oncogene* **34**, 986–995 (2015).
159. Yamazaki, D. *et al.* Basolateral Mg²⁺ Extrusion via CNNM4 Mediates Transcellular Mg²⁺ Transport across Epithelia: A Mouse Model. *PLoS Genet.* **9**, (2013).
160. Funato, Y. *et al.* Membrane protein CNNM4 – dependent Mg²⁺ efflux suppresses tumor progression Find the latest version : Membrane protein CNNM4 – dependent Mg²⁺ efflux suppresses tumor progression. **124**, 5398–5410 (2014).
161. Feord, H. K., Dear, F. E. G., Obbard, D. J. & Van Ooijen, G. A magnesium transport protein related to mammalian SLC41 and bacterial MgtE Contributes to circadian timekeeping in a unicellular green alga. *Genes (Basel)*. **10**, (2019).
162. Goytain, A. & Quamme, G. A. Functional characterization of human SLC41A1, a Mg²⁺ transporter with similarity to prokaryotic MgtE Mg²⁺ transporters.

Bibliografia

- Physiol. Genomics* **21**, 337–342 (2005).
163. Goytain, A. & Quamme, G. A. Functional characterization of the human solute carrier, SLC41A2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **330**, 701–705 (2005).
164. Schindl, R., Weghuber, J., Romanin, C. & Schweyen, R. J. Mrs2p forms a high conductance Mg²⁺ selective channel in mitochondria. *Biophys. J.* **93**, 3872–3883 (2007).
165. Zhou, H. & Clapham, D. E. Mammalian MagT1 and TUSC3 are required for cellular magnesium uptake and vertebrate embryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 15750–15755 (2009).
166. Goytain, A. & Quamme, G. A. Identification and characterization of a novel mammalian Mg²⁺ transporter with channel-like properties. *BMC Genomics* **6**, 1–18 (2005).
167. Rainier, S., Chai, J.-H., Tokarz, D., Nicholls, R. D. & Fink, J. K. NIPA1 Gene Mutations Cause Autosomal Dominant Hereditary Spastic Paraplegia (SPG6). *Am. J. Hum. Genet.* **73**, 967–971 (2003).
168. Vallipuram, J., Grenville, J. & Crawford, D. A. The E646D-ATP13A4 mutation associated with autism reveals a defect in calcium regulation. *Cell. Mol. Neurobiol.* **30**, 233–246 (2010).
169. Kobayashi, H. *et al.* Identification of the domains in cyclin A required for binding to, and activation of, p34cdc2 and p32cdk2 protein kinase subunits. *Mol. Biol. Cell* **3**, 1279–94 (1992).
170. Yang, J. & Kornbluth, S. All aboard the cyclin train: Subcellular trafficking of cyclins and their CDK partners. *Trends Cell Biol.* **9**, 207–210 (1999).
171. De Baaij, J. H. F. *et al.* Membrane topology and intracellular processing of cyclin M2 (CNNM2). *J. Biol. Chem.* **287**, 13644–13655 (2012).
172. Wang, C. *et al.* family. **9**, 1–9 (2004).
173. Chandran, U. *et al.* Expression of Cnnm1 and Its Association with Stemness, Cell Cycle, and Differentiation in Spermatogenic Cells in Mouse Testis. *Biol. Reprod.* **95**, 7–7 (2016).
174. Alderton, A., Davies, P., Illman, K. & Brown, D. R. Ancient conserved domain protein-1 binds copper and modifies its retention in cells. *J. Neurochem.* **103**, 312–321 (2007).
175. Goytain, A. & Quamme, G. A. Functional characterization of ACDP2 (ancient conserved domain protein), a divalent metal transporter. *Physiol. Genomics* **22**, 382–389 (2005).
176. Quamme, G., Biber, J. & Murer, H. Sodium-phosphate cotransport in OK cells: inhibition by PTH and ‘adaptation’ to low phosphate. *Am. J. Physiol. Physiol.*

Bibliografia

- 257**, F967–F973 (1989).
177. Yamazaki, D., Funato, Y., Miyata, H., Ikawa, M. & Miki, H. Complementary role of CNNM2 in sperm motility and Ca²⁺influx during capacitation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **474**, 441–446 (2016).
 178. Hardy, S. *et al.* The protein tyrosine phosphatase PRL-2 interacts with the magnesium transporter CNNM3 to promote oncogenesis. *Oncogene* **34**, 986–995 (2015).
 179. Chandran, U. *et al.* Expression of Cnm1 and Its Association with Stemness, Cell Cycle, and Differentiation in Spermatogenic Cells in Mouse Testis. *Biol. Reprod.* **95**, 7–7 (2016).
 180. Voets, T., Janssens, A., Droogmans, G. & Nilius, B. Outer Pore Architecture of a Ca²⁺-selective TRP Channel. *J. Biol. Chem.* **279**, 15223–15230 (2004).
 181. Giménez-Mascarell, P. *et al.* Current Structural Knowledge on the CNNM Family of Magnesium Transport Mediators. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
 182. Li, H. *et al.* Genetics of Magnesium Disorders. *Kidney Dis.* **3**, 85–97 (2017).
 183. Ohi, K. *et al.* The impact of the genome-wide supported variant in the cyclin M2 gene on gray matter morphology in schizophrenia. *Behav. Brain Funct.* **9**, 1–9 (2013).
 184. Rose, E. J. *et al.* Effects of a novel schizophrenia risk variant rs7914558 at CNNM2 on brain structure and attributional style. *Br. J. Psychiatry* **204**, 115–121 (2014).
 185. Guan, F. *et al.* Two-stage replication of previous genome-wide association studies of AS3MT-CNNM2-NT5C2 gene cluster region in a large schizophrenia case–control sample from Han Chinese population. *Schizophr. Res.* **176**, 125–130 (2016).
 186. Funato, Y., Yamazaki, D. & Miki, H. Renal function of cyclin M2 Mg²⁺ transporter maintains blood pressure. *J. Hypertens.* **35**, 585–592 (2017).
 187. Kieboom, B. C. T. *et al.* Serum magnesium and the risk of prediabetes: a population-based cohort study. *Diabetologia* **60**, 843–853 (2017).
 188. Ravassipour, D. B. *et al.* Variation in dental and skeletal open bite malocclusion in humans with amelogenesis imperfecta. *Arch. Oral Biol.* **50**, 611–623 (2005).
 189. Luder, H. U., Gerth-Kahlert, C., Ostertag-Benzinger, S. & Schorderet, D. F. Dental Phenotype in Jalili Syndrome Due to a c.1312 dupC Homozygous Mutation in the CNNM4 Gene. *PLoS One* **8**, 6–12 (2013).
 190. Parry, D. A. *et al.* Mutations in CNNM4 cause Jalili syndrome, consisting of autosomal-recessive cone-rod dystrophy and amelogenesis imperfecta. *Am. J. Hum. Genet.* **84**, 266–273 (2008).

Bibliografia

191. Jalili, I. K. & Smith, N. J. A progressive cone-rod dystrophy and amelogenesis imperfecta: a new syndrome. *J. Med. Genet.* **25**, 738–740 (1988).
192. Cherkaoui Jaouad, I. *et al.* Novel splice site mutation in CNNM4 gene in a family with Jalili syndrome. *Eur. J. Med. Genet.* **60**, 239–244 (2017).
193. Polok, B. *et al.* Mutations in CNNM4 cause recessive cone-rod dystrophy with amelogenesis imperfecta. *Am. J. Hum. Genet.* **84**, 259–265 (2008).
194. Rahimi-Aliabadi, S. *et al.* A novel mutation and variable phenotypic expression in a large consanguineous pedigree with Jalili syndrome. *Eye* **30**, 1424–1432 (2016).
195. Sebai, M.-A. *et al.* Autozygome-guided exome sequencing in retinal dystrophy patients reveals pathogenetic mutations and novel candidate disease genes. *Genome Res.* 236–247 (2012). doi:10.1101/gr.144105.112
196. Prasad, M. K. *et al.* A targeted next-generation sequencing assay for the molecular diagnosis of genetic disorders with orodental involvement. *J. Med. Genet.* **53**, 98–110 (2015).
197. Doucette, L. *et al.* Molecular genetics of achromatopsia in newfoundland reveal genetic heterogeneity, founder effects and the first cases of jalili syndrome in North America. *Ophthalmic Genet.* **34**, 119–129 (2013).
198. Topçu, V. *et al.* A new familial case of Jalili syndrome caused by a novel mutation in {CNNM}4. *Ophthalmic Genet.* **38**, 161–166 (2016).
199. Maia, C. M. F. *et al.* Report of two unrelated families with Jalili syndrome and a novel nonsense heterozygous mutation in CNNM4 gene. *Eur. J. Med. Genet.* **61**, 384–387 (2018).
200. Sponder, G. *et al.* Human CNNM2 is not a Mg²⁺-transporter per se. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **468**, 1223–1240 (2016).
201. Sponder, G., Svidova, S., Schweigel, M., Vormann, J. & Kolisek, M. Splice-variant 1 of the ancient domain protein 2 (ACDP2) complements the magnesium-deficient growth phenotype of Salmonella enterica sv. typhimurium strain MM281. *Magnes. Res.* **23**, 105–114 (2010).
202. Yamazaki, D. *et al.* Basolateral Mg²⁺ Extrusion via CNNM4 Mediates Transcellular Mg²⁺ Transport across Epithelia: A Mouse Model. *PLoS Genet.* **9**, (2013).
203. Yamazaki, D. *et al.* The Mg²⁺ transporter CNNM4 regulates sperm Ca²⁺ homeostasis and is essential for reproduction. *J. Cell Sci.* **129**, 1940–1949 (2016).
204. Yamazaki, D. *et al.* The Mg²⁺ transporter CNNM4 regulates sperm Ca²⁺ homeostasis and is essential for reproduction. *J. Cell Sci.* **129**, 1940–1949

Bibliografía

- (2016).
205. Yamazaki, D. *et al.* Cnm4 deficiency suppresses Ca²⁺ signaling and promotes cell proliferation in the colon epithelia. *Oncogene* 0–7 (2019). doi:10.1038/s41388-019-0682-0
 206. Vinuesa, A. G. *et al.* Vanilloid receptor-1 regulates neurogenic inflammation in colon and protects mice from colon cancer. *Cancer Res.* **72**, 1705–1716 (2012).
 207. Islam, Z. *et al.* Identification and lateral membrane localization of cyclin M3, likely to be involved in renal Mg²⁺ handling in seawater fish. *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.* **307**, R525–R537 (2014).
 208. Kovjazin, R. & Carmon, L. The use of signal peptide domains as vaccine candidates. *Hum. Vaccines Immunother.* **10**, 2733–2740 (2014).
 209. Corral-Rodríguez, M. Á. *et al.* Nucleotide binding triggers a conformational change of the CBS module of the magnesium transporter CNNM2 from a twisted towards a flat structure. *Biochem. J.* **464**, 23–34 (2014).
 210. Xiao, B. *et al.* Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature* **472**, 230–233 (2011).
 211. Pessoa, J., Fonseca, F., Furini, S. & Morais-Cabral, J. H. Determinants of ligand selectivity in a cyclic nucleotide-regulated potassium channel. *J. Gen. Physiol.* **144**, 41–54 (2014).
 212. Hirata, Y., Funato, Y. & Miki, H. Basolateral sorting of the Mg²⁺ transporter CNNM4 requires interaction with AP-1A and AP-1B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **455**, 184–189 (2014).
 213. Bonifacino, J. S. Adaptor proteins involved in polarized sorting. *J. Cell Biol.* **204**, 7–17 (2014).
 214. Traub, L. M. & Bonifacino, J. S. Cargo Recognition in Clathrin-Mediated. 1–24 (2018). doi:10.1101/cshperspect.a016790
 215. J.W., S. *et al.* CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *J. Clin. Invest.* **113**, 274–284 (2004).
 216. Shabb, J. B. & Corbin, J. D. Cyclic nucleotide-binding domains in proteins having diverse functions. *J. Biol. Chem.* **267**, 5723–5726 (1992).
 217. Ng, L. C. T., Putrenko, I., Baronas, V., Van Petegem, F. & Accili, E. A. Cyclic Purine and Pyrimidine Nucleotides Bind to the HCN2 Ion Channel and Variably Promote C-Terminal Domain Interactions and Opening. *Structure* **24**, 1629–1642 (2016).
 218. Gouaux, E. *et al.* Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels. *Nature* **425**, 200–205 (2003).

Bibliografia

219. Wei, M., Korotkov, K. V. & Blackburn, J. S. Targeting phosphatases of regenerating liver (PRLs) in cancer. *Pharmacol. Ther.* **190**, 128–138 (2018).
220. Julien, S. G., Dubé, N., Hardy, S. & Tremblay, M. L. Inside the human cancer tyrosine phosphatome. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 35–49 (2011).
221. Hardy, S., Wong, N. N., Muller, W. J., Park, M. & Tremblay, M. L. Overexpression of the protein tyrosine phosphatase PRL-2 correlates with breast tumor formation and progression. *Cancer Res.* **70**, 8959–8967 (2010).
222. Kobayashi, A. *et al.* Identification of a multipotent self-renewing stromal progenitor population during mammalian kidney organogenesis. *Stem Cell Reports* **3**, 650–662 (2014).
223. Zeng, Q. *et al.* Prenylation-dependent association of protein-tyrosine phosphatases PRL-1, -2, and -3 with the plasma membrane and the early endosome. *J. Biol. Chem.* **275**, 21444–21452 (2000).
224. Dumauval, C. M., Sandusky, G. E., Crowell, P. L. & Randall, S. K. Cellular localization of PRL-1 and PRL-2 gene expression in normal adult human tissues. *J. Histochem. Cytochem.* **54**, 1401–1412 (2006).
225. Peng, L. *et al.* PRL-3 promotes the motility, invasion, and metastasis of LoVo colon cancer cells through PRL-3-integrin β 1-ERK1/2 and-MMP2 signaling. *Mol. Cancer* **8**, 1–13 (2009).
226. Fiordalisi, J. J., Keller, P. J. & Cox, A. D. PRL tyrosine phosphatases regulate Rho family GTPases to promote invasion and motility. *Cancer Res.* **66**, 3153–3161 (2006).
227. Wang, H. *et al.* PRL-3 down-regulates PTEN expression and signals through PI3K to promote epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res.* **67**, 2922–2926 (2007).
228. Stephens, B., Han, H., Hostetter, G., Demeure, M. J. & Von Hoff, D. D. Small interfering RNA-mediated knockdown of PRL phosphatases results in altered Akt phosphorylation and reduced clonogenicity of pancreatic cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 202–210 (2008).
229. Wang, J. Y. *et al.* Vaccinia H1-related phosphatase is a phosphatase of ErbB receptors and is down-regulated in non-small cell lung cancer. *J. Biol. Chem.* **286**, 10177–10184 (2011).
230. Krndija, D. *et al.* The phosphatase of regenerating liver 3 (PRL-3) promotes cell migration through Arf-activity-dependent stimulation of integrin α 5 recycling. *J. Cell Sci.* **125**, 3883–3892 (2012).
231. Kostantin, E. *et al.* Inhibition of PRL-2·CNNM3 protein complex formation decreases breast cancer proliferation and tumor growth. *J. Biol. Chem.* **291**,

Bibliografía

- 10716–10725 (2016).
232. Froger, A. & Hall, J. E. Transformation of Plasmid DNA into *E. coli* Using the Heat Shock Method. *J. Vis. Exp.* 2007 (2007). doi:10.3791/253
233. Polayes, D. A., Parks, T. D., Johnston, S. A. & Dougherty, W. G. Application of TEV Protease in Protein Production. *Mol. diagnosis Infect. Dis.* **13**, 169 (1998).
234. Kulkarni, G. V & Deobagkar, D. D. A cytosolic form of aminopeptidase P from *Drosophila melanogaster*: molecular cloning and characterization. *J. Biochem.* **131**, 445–52 (2002).
235. Gómez García, I., Oyenarte, I. & Martínez-Cruz, L. A. Purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of the CBS pair of the human metal transporter CNNM4. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **67**, 349–353 (2011).
236. Eichele, G., Ford, G. C. & Jansonius, J. N. Crystallization of pig mitochondrial aspartate aminotransferase by seeding with crystals of the chicken mitochondrial isoenzyme. *J. Mol. Biol.* **135**, 513–516 (1979).
237. Incardona, M. F. *et al.* EDNA: A framework for plugin-based applications applied to X-ray experiment online data analysis. *J. Synchrotron Radiat.* **16**, 872–879 (2009).
238. Kabsch, W. XDS. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 125–132 (2010).
239. Vonrhein, C. *et al.* Data processing and analysis with the autoPROC toolbox. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **67**, 293–302 (2011).
240. McCoy, A. J. *et al.* Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **40**, 658–674 (2007).
241. Read, R. J. & Schierbeek, A. J. A phased translation function. *J. Appl. Crystallogr.* **21**, 490–495 (1988).
242. Winn, M. D. *et al.* Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **67**, 235–242 (2011).
243. Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: Model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2126–2132 (2004).
244. Terwilliger, T. C. *et al.* Decision-making in structure solution using Bayesian estimates of map quality: The PHENIX AutoSol wizard. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **65**, 582–601 (2009).
245. Davis, I. W. *et al.* MolProbity: All-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* **35**, 375–383 (2007).
246. Pettersen, E. F. *et al.* UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–1612 (2004).

Bibliografía

247. Sheldrick, G. M. Experimental phasing with SHELXC/D/E: Combining chain tracing with density modification. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 479–485 (2010).
248. Cowtan, K. The Buccaneer software for automated model building. 1. Tracing protein chains. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **62**, 1002–1011 (2006).
249. Rambo, R. P. & Tainer, J. A. Super-Resolution in Solution X-Ray Scattering and Its Applications to Structural Systems Biology. *Annu. Rev. Biophys.* **42**, 415–441 (2013).
250. Zheng, W. & Best, R. B. An Extended Guinier Analysis for Intrinsically Disordered Proteins. *J. Mol. Biol.* **430**, 2540–2553 (2018).
251. Franke, D. *et al.* ATSAS 2.8: A comprehensive data analysis suite for small-angle scattering from macromolecular solutions. *J. Appl. Crystallogr.* **50**, 1212–1225 (2017).
252. Franke, D. & Svergun, D. I. DAMMIF , a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering . *J. Appl. Crystallogr.* **42**, 342–346 (2009).
253. Svergun, D. I., Petoukhov, M. V & Koch, M. H. J. Determination of Domain Structure of Proteins from X-Ray Solution Scattering. *Biophys. J.* **80**, 2946–2953 (2001).
254. Petoukhov, M. V. *et al.* New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis . *J. Appl. Crystallogr.* **45**, 342–350 (2012).
255. Schneidman-Duhovny, D., Hammel, M., Tainer, J. A. & Sali, A. FoXS, FoXSDock and MultiFoXS: Single-state and multi-state structural modeling of proteins and their complexes based on SAXS profiles. *Nucleic Acids Res.* **44**, W424–W429 (2016).
256. Petoukhov, M. V. & Svergun, D. I. Global rigid body modeling of macromolecular complexes against small-angle scattering data. *Biophys. J.* **89**, 1237–1250 (2005).
257. Huang, G. Y. *et al.* Structural basis for cyclic-nucleotide selectivity and cGMP-selective activation of PKG i. *Structure* **22**, 116–124 (2014).
258. Gómez-García, I. *et al.* Purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of the CBS-domain pair of cyclin M2 (CNNM2). *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **68**, 1198–1203 (2012).
259. Vagin, A. & Teplyakov, A. Molecular replacement with MOLREP . *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 22–25 (2010).
260. Diseases, M. Solvent Content of Protein. *J. Mol. Biol.* **33**, 491–497 (1968).
261. Rossmann M. G., B. D. M. The detection of sub-units within the crystallographic

Bibliografía

- assymmetric unit. 24–31 (1962). doi:10.1107/S0365110X62000067
262. Ereño-Orbea, J., Majtan, T., Oyenarte, I., Kraus, J. P. & Martínez-Cruz, L. A. Structural insight into the molecular mechanism of allosteric activation of human cystathionine β -synthase by S -adenosylmethionine . *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, E3845–E3852 (2014).
263. Brelidze, T. I., Carlson, A. E., Sankaran, B. & Zagotta, W. N. Structure of the carboxy-terminal region of a KCNH channel. *Nature* **481**, 530–533 (2012).
264. Rambo, R. P. & Tainer, J. A. *Biopolymers Volume 95 / Number 8* 559. **95**, (2011).
265. Konarev, P. V., Volkov, V. V., Sokolova, A. V., Koch, M. H. J. & Svergun, D. I. PRIMUS: A Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Crystallogr.* **36**, 1277–1282 (2003).
266. Petoukhov, M. V. & Svergun, D. I. Analysis of X-ray and neutron scattering from biomacromolecular solutions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **17**, 562–571 (2007).
267. Bessette, D. C., Qiu, D. & Pallen, C. J. PRL PTPs : mediators and markers of cancer progression. **1**, 231–252 (2008).
268. Invasion, T. *et al.* Structure and Biochemical Properties of PRL-1 , a Phosphatase Implicated in Cell. 12009–12021 (2005).
269. Giménez-Mascarell, P. *et al.* Structural basis of the oncogenic interaction of phosphatase PRL-1 with the magnesium transporter CNNM2. *J. Biol. Chem.* **292**, 786–801 (2017).
270. Giménez-Mascarell, P. *et al.* Structural basis of the oncogenic interaction of phosphatase PRL-1 with the magnesium transporter CNNM2. *J. Biol. Chem.* (2017). doi:10.1074/jbc.M116.759944
271. Funato, Y. & Miki, H. Molecular function and biological importance of CNNM family Mg 2 + transporters. (2018).
272. Funato, Y., Furutani, K., Kurachi, Y. & Miki, H. CrossTalk proposal: CNNM proteins are Na + /Mg 2+ exchangers playing a central role in transepithelial Mg 2+ (re)absorption. *J. Physiol.* **596**, 743–746 (2018).
273. Arjona, F. J. & de Baaij, J. H. F. CrossTalk opposing view: CNNM proteins are not Na+/Mg2+exchangers but Mg2+transport regulators playing a central role in transepithelial Mg2+(re)absorption. *J. Physiol.* **596**, 747–750 (2018).
274. Meyer, S. & Dutzler, R. Crystal structure of the cytoplasmic domain of the chloride channel ClC-0. *Structure* **14**, 299–307 (2006).
275. Yan, Y., Zhou, X. E., Xu, H. E. & Melcher, K. Structure and Physiological Regulation of AMPK. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
276. Gulerez, I. *et al.* Phosphocysteine in the PRL-CNNM pathway mediates

Bibliografia

- magnesium homeostasis. *EMBO Rep.* **17**, 1890–1900 (2016).
277. Dai, G., James, Z. M. & Zagotta, W. N. Dynamic rearrangement of the intrinsic ligand regulates KCNH potassium channels. *J. Gen. Physiol.* **150**, 625–635 (2018).
278. Zhao, Y., Goldschen-Ohm, M. P., Morais-Cabral, J. H., Chanda, B. & Robertson, G. A. The intrinsically liganded cyclic nucleotide-binding homology domain promotes KCNH channel activation. *J. Gen. Physiol.* **149**, 249–260 (2017).
279. Marques-Carvalho, M. J. *et al.* Structural, biochemical, and functional characterization of the cyclic nucleotide binding homology domain from the mouse EAG1 potassium channel. *J. Mol. Biol.* **423**, 34–46 (2012).
280. Chen, Y. S. *et al.* The cyclic nucleotide-binding homology domain of the integral membrane protein CNNM mediates dimerization and is required for Mg²⁺ efflux activity. *J. Biol. Chem.* (2018). doi:10.1074/jbc.RA118.005672
281. Zhang, H. *et al.* PRL3 phosphatase active site is required for binding the putative magnesium transporter CNNM3. *Sci. Rep.* **7**, 1–9 (2017).
282. Denu, J. M., Lohse, D. L., Vijayalakshmi, J., Saper, M. A. & Dixon, J. E. Visualization of intermediate and transition-state structures in protein-tyrosine phosphatase catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 2493–2498 (1996).
283. Jeong, D. G. *et al.* Trimeric structure of PRL-1 phosphatase reveals an active enzyme conformation and regulation mechanisms. *J. Mol. Biol.* **345**, 401–413 (2005).
284. Bai, Y. *et al.* PRL-1 protein promotes ERK1/2 and RhoA protein activation through a non-canonical interaction with the Src homology 3 domain of p115 Rho GTPase-activating protein. *J. Biol. Chem.* **286**, 42316–42324 (2011).
285. Min, S. H. *et al.* New p53 target, phosphatase of regenerating liver 1 (PRL-1) downregulates p53. *Oncogene* **28**, 545–554 (2009).
286. Rios, P., Li, X. & Köhn, M. Molecular mechanisms of the PRL phosphatases. *FEBS J.* **280**, 505–524 (2013).
287. Arjona, F. J. *et al.* CNNM2 Mutations Cause Impaired Brain Development and Seizures in Patients with Hypomagnesemia. *PLoS Genet.* **10**, (2014).

8. Publicaciones

Publicaciones

Los resultados presentados en esta memoria han sido publicados en los siguientes artículos:

Giménez-Mascarell P, Oyenarte I, Hardy S, Breiderhoff T, Stuver M, Kostantin E, Diercks T, Pey AL, Ereño-Orbea J, Martínez-Chantar ML, Khalaf-Nazzal R, Claverie-Martin F, Müller D, Tremblay ML, Martínez-Cruz LA. Structural Basis of the Oncogenic Interaction of Phosphatase PRL-1 with the Magnesium Transporter CNNM2. *J Biol Chem.* **3**, 786-801 (2017)

Giménez-Mascarell P, Schirmacher CE, Martínez-Cruz LA, Müller D. Novel Aspects of Renal Magnesium Homeostasis. *Front Pediatr.* **6** (2018) Review.

Giménez-Mascarell P, González-Recio I, Fernández-Rodríguez C, Oyenarte I, Müller D, Martínez-Chantar ML, Martínez-Cruz LA. Current Structural Knowledge on the CNNM Family of Magnesium Transport Mediators. *Int J Mol Sci.* **20**.(2019) Review.

Giménez-Mascarell P, Oyenarte I, González-Recio I, Fernández-Rodríguez C, Corral-Rodríguez MA, Campos-Zarraga I, Simón J, Kostantin E, Hardy S, Díaz-Quintana A, Zubillaga-Lizeaga M, Merino N, Diercks T, Blanco FJ, Díaz-Moreno I, Martínez-Chantar ML, Tremblay ML, Müller D, Siliqi D and Martínez-Cruz LA, Structural insights into the intracellular region of the human magnesium transport mediator CNNM4. *Submitted*