

Trabajo fin de grado
Grado en Bioquímica y Biología Molecular

Caracterización del estado oligomérico y de los potenciales ligandos del dominio cNMP del transportador de magnesio CNNM4.

Autora:
Mara Zubillaga Lizeaga
Tutores:
Alfonso Martínez
Francisco Blanco
Co-director:
Diego Marcelo Guerin

Leioa, 23 de Junio de 2015

ÍNDICE

Introducción	3
Objetivos	5
Materiales y métodos	5
• Sobreexpresión de las proteínas ¹⁵ N marcadas	5
• Purificación de las proteínas ¹⁵ N marcadas	6
• SEC-MALLS	7
• Dicroísmo Circular	7
• RMN	7
Resultados	8
• SEC-MALLS	8
• Dicroísmo Circular	9
• RMN	11
Discusión	13
Conclusión	15
Bibliografía	15

Introducción

El magnesio (Mg^{2+}), el catión divalente más abundante de las células, tiene una función crucial en gran número de procesos enzimáticos y metabólicos, de manera que es esencial para la vida. Es el cofactor de todas las reacciones enzimáticas que involucran el consumo de ATP, interviene en la contracción muscular, participa en la producción y en el transporte de la energía y además, interviene en la síntesis de proteínas y de ácidos nucleicos [1,2].

El contenido corporal de Mg^{2+} se encuentra ampliamente distribuido por el organismo. Para que todos los procesos en los que participa este ion transcurran adecuadamente, es necesario que su concentración intracelular se mantenga dentro de unos límites concretos. De ello se encargan varias familias de proteínas que facilitan su transporte hacia el interior o hacia el exterior celular mediante la formación de poros en la membrana plasmática o en las membranas de orgánulos intracelulares. El proceso de transporte puede implicar o no el consumo de energía. En el primer caso las proteínas implicadas son los transportadores, mientras que en el segundo son los canales iónicos. La disfunción en el transporte del Mg^{2+} está vinculada a diferentes patologías como la osteoporosis, diabetes, hipertensión, trastornos neurológicos e inmunodeficiencia [3].

Para evitar las graves consecuencias de la deficiencia de Mg^{2+} , el cuerpo posee un sistema especializado que mantiene los niveles séricos del Mg^{2+} dentro de ciertos límites. El 90% de la absorción de este ion se realiza en el intestino delgado y el resto en el estómago y en el intestino grueso. Una vez absorbido, es transportado a los distintos tejidos. Alrededor del 60% se encuentra en el hueso, 20% en el músculo, 19% en otras células y aproximadamente 1% en el líquido extracelular [2]. La mayor absorción de Mg^{2+} se lleva a cabo en el epitelio intestinal, y esta absorción es complementada por una reabsorción en el riñón. El 65-70% del Mg^{2+} disuelto en la pre-orina se reabsorbe en una región de la nefrona conocida como el asa de Henle [3,4].

Entre las proteínas implicadas en el transporte de Mg^{2+} , la familia menos estudiada es la conocida como familia de ciclinas M (CNNMs), codificada por cuatro genes en humanos, CNNM1-CNNM4 [5]. Estas proteínas se expresan durante todo el desarrollo y en todos los tejidos adultos excepto CNNM1, expresada principalmente en el cerebro [3]. Se ha demostrado que CNNM2 se expresa en la membrana basolateral del segmento tubular distal

(DCT) de la nefrona [6]. En cambio, CNNM4, su homólogo más cercano, se expresa en la membrana basolateral del epitelio intestinal [7].

Mutaciones en CNNM2 causan hipomagnesemia familiar dominante, una patología caracterizada por la pérdida del ion Mg^{2+} con manifestaciones clínicas que incluyen tetania, convulsiones y arritmias cardiacas [6]. Por otra parte, las mutaciones en CNNM4 están ligadas al Síndrome de Jalili, un trastorno genético caracterizado por la combinación de distrofia de conos y bastones de la retina y amelogénesis imperfecta [8,9].

Estructuralmente, las CNNMs son proteínas multidominio constituidas por un dominio N-terminal extracelular que precede a un dominio transmembrana (DUF21) y un módulo Bateman, potencialmente regulador, que está constituido por dos motivos Cystathionine- β -synthase (CBS): CBS1 y CBS2 [5]. A este módulo Bateman le sigue un dominio, cuya secuencia de aminoácidos se asemeja a la de un dominio de unión a nucleótidos cíclicos (dominio cNMP).

El módulo Bateman representa una región de interacción con iones y/o nucleótidos, tal y como sucede en algunos transportadores iónicos bacterianos como CorC y MgtE. Este módulo posee la capacidad de autoasociarse formando estructuras diméricas en forma de disco, sugiriendo un estado dimérico para la proteína *full-length* [3]. La función, estructura y ligandos del dominio cNMP se desconocen actualmente.

El objetivo de este proyecto ha consistido en sobreexpresar y purificar dos fragmentos de diferente tamaño molecular que contienen el dominio cNMP de la proteína CNNM4; para caracterizar posteriormente su estado oligomérico, su capacidad potencial de unir nucleótidos cíclicos (cAMP y el cGMP), y los posibles cambios conformacionales inducidos por unión a dichas moléculas [10,11]. Hemos llevado a cabo un estudio multidisciplinar que combina técnicas de biología molecular, bioquímica y biofísica.

Los dos fragmentos empleados en el estudio son: (i) CNNM4₅₄₅₋₇₇₅ (residuos 545-775, Mw=26,2 kDa) y (ii) CNNM4₅₄₅₋₇₃₀, (residuos 545-730, Mw=21,2 kDa). El fragmento corto (CNNM4₅₄₅₋₇₃₀) se diferencia del largo (CNNM4₅₄₅₋₇₇₅) en la ausencia de una α -hélice en el extremo carboxilo (según la predicción de estructura secundaria). Por su masa molecular,

ambos fragmentos son susceptibles de estudio por Resonancia Magnética Nuclear (RMN), incluso en el caso de que la proteína dimerizase en disolución.

Objetivos

Los objetivos de este proyecto son los siguientes:

- Sobreexpresar los fragmentos CNNM4₅₄₅₋₇₃₀ y CNNM4₅₄₅₋₇₇₅ (dominio cNMP de CNNM4) en bacterias (*E. coli*), marcados con ¹⁵N.
- Purificar los fragmentos ¹⁵N-CNNM4₅₄₅₋₇₃₀ y ¹⁵N-CNNM4₅₄₅₋₇₇₅
- Determinar el estado oligomérico de ambos fragmentos en disolución por técnicas de SEC-MALLS.
- Analizar la estructura secundaria de ¹⁵N-CNNM4₅₄₅₋₇₃₀ y ¹⁵N-CNNM4₅₄₅₋₇₇₅ por dicroísmo circular.
- Valorar la interacción del dominio cNMP con cGMP y cAMP por RMN.

Materiales y métodos

Sobreexpresión de las proteínas ¹⁵N marcadas

Se partió de cepas de *Escherichia coli* BL21 (DE3) previamente transformadas con un plásmido que codifica para las secuencias CNNM4₅₄₅₋₇₇₅ y CNNM4₅₄₅₋₇₃₀. Después del crecimiento de las bacterias en 10 mL de LB con 0,1 mg/mL ampicilina durante 7 horas a 37 °C, se resuspendió en 100 mL del medio preinocular (P-0,5G) y se incubó durante la noche a 37 °C. El medio P-0,5G está compuesto por 0,5 % glucosa, 1 mM MgSO₄, 0,003 % Tiamina, 0,1 mg/mL D-Biotina, 10 mL de 10xNPS sin marcaje* y 0,1 mg/mL de ampicilina disueltos en agua. Se guardó una alícuota del preinóculo para medir la densidad óptica (DO).

Al día siguiente, se añadió el preinóculo a 1 L de medio autoinducible P-5052 (¹⁵N) previamente preparado. Se incubó a 37 °C durante 2 horas, se dejó inducir a 20 °C durante 24 horas y se midió la DO (a 600 nm) del medio inducido. El medio P-5052 está compuesto por 1 M MgSO₄·7H₂O, 2 mL elementos traza, 0,1 mg/mL D-Biotina, 1 % Tiamina, 100 mL de 10x¹⁵N-NPS**, 40 mL de la disolución 25x5052*** y 0,1 mg/mL de ampicilina. Para mantener estériles los cultivos, por una parte se autoclavó el agua a 134 °C durante 2 horas; y por otro lado, se utilizó un filtro de 0,22 µm para filtrar cada uno de los solutos.

10 mL de 10xNPS*	100 mL de 10x¹⁵N-NPS**	40 mL de 25x5052***
0,25 M (NH ₄) ₂ SO ₄	0,46 M [U- ¹⁵ N] NH ₄ Cl	12,5 % Glicerol (v/v)
0,5 M KH ₂ PO ₄	0,05 M Na ₂ SO ₄	1,25 % Glucosa (w/v)
0,5 M Na ₂ HPO ₄	0,5 M KH ₂ PO ₄	5 % α-lactosa (w/v)
	0,5 M Na ₂ HPO ₄	

Tabla I. Se muestran las soluciones previamente preparadas que se deben añadir a los medios. Cada una de estas disoluciones se filtra con un filtro de 0,22 µm.

Purificación de las proteínas ¹⁵N marcadas

Se realizó una centrifugación del cultivo con las bacterias crecidas en el medio P-5052 (¹⁵N) a 4500 r.p.m durante 30 minutos y se resuspendió el pellet en el buffer de lisis (50 mM TRIS pH 8, 300 mM NaCl, 25 mM Imidazole, 5 mM β-mercaptoethanol (BME), 0,1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM Benzamidine y DNAsa). El volumen del buffer de lisis fue calculado con la fórmula 6 x DO x Volumen del cultivo inducido. Una vez sonificado por 5 minutos realizando 15 ciclos (20 segundos *on* y 59 segundos *off*), se ultracentrifugó durante 1 hora a 35000 r.p.m y a 4 °C. Se utilizó un filtro de 0,2 µm para filtrar el sobrenadante y se corrió una cromatografía de afinidad utilizando una columna HistTrap HP de 5 mL. Para ello, se prepararon el Buffer A (50 mM TRIS pH 8, 300 mM NaCl, 25 mM Imidazole y 5 mM Betamercaptoetanol) y el Buffer B, el cual lleva una concentración de Imidazol de 300 mM además de los componentes del buffer A. Se corrió un gel SDS-PAGE para seleccionar las fracciones que contenían la proteína de interés y se realizó una diálisis en 50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl y 5 mM BME, a 4°C durante la noche. Durante la diálisis se trató la proteína con TEV, una proteasa que rompe la cola de histidinas. A continuación, se corrió una segunda cromatografía de afinidad usando la HisTrap HP 5 mL para quedarnos con el flujo no retenido que contenía la proteína sin la cola de histidinas. Posteriormente, se concentró la proteína hasta una concentración de 1 mg/mL y se corrió una cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna de Gel filtration Hi Load 16/600 Superdex 200 con un Buffer de 20 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid) pH 7,4, 200 mM NaCl y 5 mM BME. La proteína pura resultante de la gel filtración, se concentró hasta 2 mg/mL, se alicuotó en volúmenes de 100 µL y se congeló mediante inmersión en N₂ líquido.

SEC- MALLS (Size Exclusion Chromatography-Multiangle Laser Light Scattering)

Los experimentos de dispersión de luz estática se realizaron a 20 °C empleando una columna Superdex 200 10/300 GL, en línea con un detector de dispersión de luz DAWN-HELEOS y un detector diferencial de índice de refracción. La columna se equilibró con un tampón de fosfato salino (PBS) con 0,03 % NaN_3 y filtrado a 0,1 μm ; y el sistema de SEC-MALLS se calibró con una muestra de Bovine serum albumin (BSA) a 1 mg/mL en el mismo tampón. Se inyectaron 100 μL de la proteína a 1 mg/mL en PBS en la columna, a una velocidad de flujo de 0,5 mL/min. El análisis de datos se realizó con el software de ASTRA. Para la calibración del aparato se utiliza la proteína BSA, que en solución forma un monómero, un dímero y un trímero de masa conocida. Los resultados previos con múltiples muestras de BSA indican que el error experimental en la masa molar es de alrededor de 5 %.

Dicroísmo Circular (CD)

Con el fin de obtener información sobre la estructura secundaria de CNNM4₅₄₅₋₇₇₅ y CNNM4₅₄₅₋₇₃₀, se utilizó el Dicroísmo Circular. Las mediciones se realizaron con un espectropolarímetro Jasco J-810. Los espectros se registraron a 25 °C en muestras de proteína a 5 μM en buffer PBS, usando cubetas de cuarzo de un paso óptico de 0,2 cm. Las curvas de desnaturalización térmica de 15 a 95 °C se registraron en las mismas muestras de proteínas y cubeta. El cambio de la elipticidad se midió a 222 nm, mediante el aumento de temperatura a una velocidad de 1 °C/min.

RMN

En los experimentos de RMN se utilizaron los fragmentos CNNM4₅₄₅₋₇₇₅ y CNNM4₅₄₅₋₇₃₀, marcados isotópicamente con ^{15}N . Para el análisis de cada fragmento se prepararon 500 μL de muestra en tubos con un diámetro de 5 mm. Para analizar el CNNM4₅₄₅₋₇₇₅ se añadieron 470 μL de la proteína (a una concentración de 80 μM en PBS pH 7,4 y 1 mM DTT), 25 μL de agua deuterada (D_2O), 5 μL NaN_3 1% y 0,5 μL DSS (dimetil-silapentane-sulfonate) 20 mM. La muestra del CNNM4₅₄₅₋₇₃₀ se preparó de la misma forma, pero con una concentración de la proteína de 100 μM . Los experimentos del fragmento largo se llevaron a cabo en un espectrómetro Bruker AVANCE III 800 MHz y los del corto en un espectrómetro Bruker AVANCE III 600 MHz. Para cada experimento realizado se registró un espectro de RMN monodimensional de protón (1D ^1H -RMN), que simplemente muestra las señales de cada uno de los átomos de hidrógeno en la proteína; y un espectro bidimensional de correlación ^1H - ^{15}N

de tipo Heteronuclear Single Quantum Coherence (2D ^1H - ^{15}N -HSQC) que muestra una señal para cada grupo NH (uno por cada aminoácido menos las prolinas, además de otras señales de las cadenas laterales de asparraguinas, glutaminas, triptófanos y arginina) [12].

Primero se analizó el fragmento largo. Se hicieron distintas mediciones con el objetivo de visualizar todos los aminoácidos del fragmento. Para empezar, se analizó la muestra a pH 7,4 y a 25 °C y al ver que se observaban bastante menos señales de las esperadas (menos que el número de aminoácidos de la proteína), se exploraron diferentes condiciones de pH y temperatura para observar el comportamiento de la proteína. Primero, se intentó bajar el pH a 6,5 y después a 5,6. A continuación, se optó por subir la temperatura a 35 °C. Por otra parte, se midió la unión a dos nucleótidos cíclicos: cGMP y cAMP. Para ello, se volvió a preparar una nueva muestra a pH 7,4 (el valor de pH fisiológico) y se añadieron primero 800 μM cGMP (ratio molar 1:10) y luego 800 μM cAMP (ratio molar 1:10).

Una vez realizado el análisis por RMN con el fragmento largo, se analizó el fragmento corto a pH 7,4 y 25 °C para estudiar si la hélice alfa del extremo carboxilo que diferencia a los dos fragmentos produce algún cambio importante en la estructura del dominio cNMP de la proteína CNNM4.

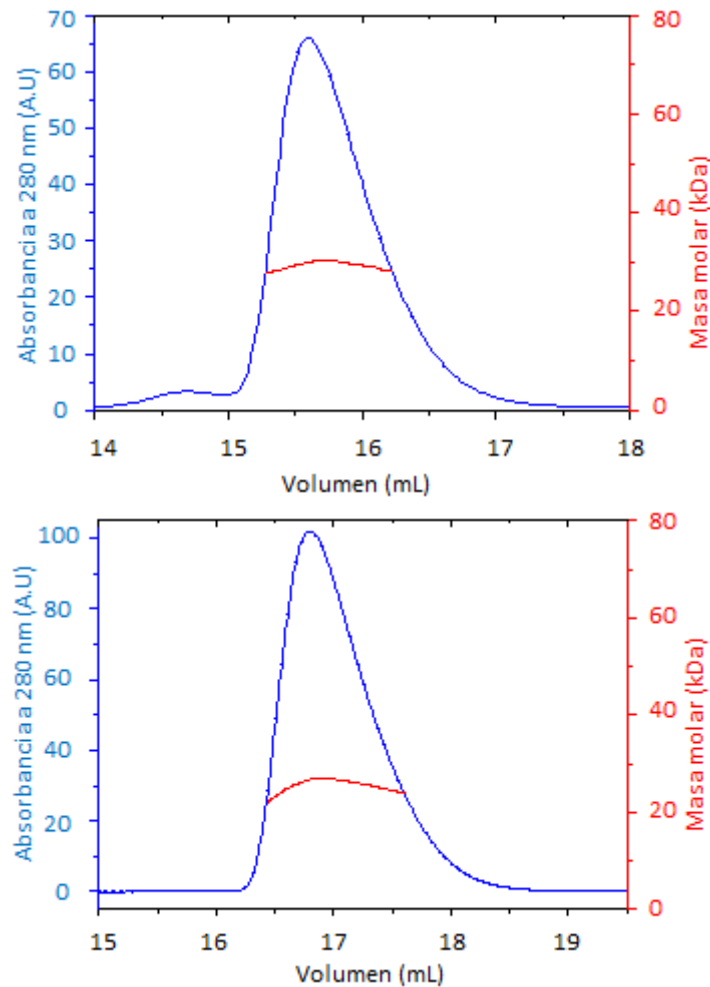
Resultados

SEC-MALLS

Gracias al SEC-MALLS se midió la masa molar y el estado oligomérico de los fragmentos analizados, independientemente del volumen de elución en la cromatografía de exclusión molecular (que depende también de la forma de la proteína). Las mediciones se hicieron calculando la cantidad de luz dispersada en cada ángulo detectado. El cálculo se basa en la intensidad de la luz medida y en la eficiencia cuántica de cada detector. Se utiliza un modelo para aproximar la intensidad de la luz dispersada en un ángulo cero y esto se relaciona con la masa molar.

Según los resultados del MALLS, el fragmento largo tiene una masa molar de 30,3 kDa y el fragmento corto de 27 kDa (*Figuras 1 y 2*). Tanto el CNNM4₅₄₅₋₇₇₅ (sin marcaje) como el CNNM4₅₄₅₋₇₃₀ (sin marcaje) se analizaron por espectrometría de masas y estos fueron los resultados obtenidos: la masa teórica del fragmento largo es de 26,2 kDa y el del corto es de 21,2 kDa. Las diferencias entre las mediciones por MALLS y espectrometría de masas se

deben a la diferente precisión y exactitud de las dos técnicas (mucho mayores en la espectrometría de masas), pero la comparación de ambas indica que el estado oligomérico de la proteína en disolución es monomérico.



Figuras 1 y 2: Se muestra la absorbancia detectada a 280 nm vs el volumen de elución (mL) de la cromatografía de exclusión molecular. La línea roja dibujada dentro de cada pico representa la masa molar (en kDa) de los fragmentos CNNM4₅₄₅₋₇₇₅ y CNNM4₅₄₅₋₇₃₀, respectivamente. La masa molar es independiente del volumen de elución.

Dicroísmo circular

La elipticidad del CD revela características importantes de la estructura secundaria de la proteína. En este caso, se han observado dos mínimos en el espectro, uno a 208 nm y el otro a 222 nm (Figura 3). Se trata de la absorción característica de las hélices α . Con el CD no se puede obtener información sobre la posición de las hélices alfa que se detectan dentro de la molécula; y tampoco predicen el número de ellas.

Se ha observado que después de la desnaturalización térmica (TD) la elipticidad es mucho menor, debido a una desnaturalización irreversible (proteína precipitada en la cubeta). El espectro de CD del fragmento CNNM4₅₄₅₋₇₃₀ es muy similar al espectro del CNNM4₅₄₅₋₇₇₅, indicando que la estructura secundaria es también muy similar.

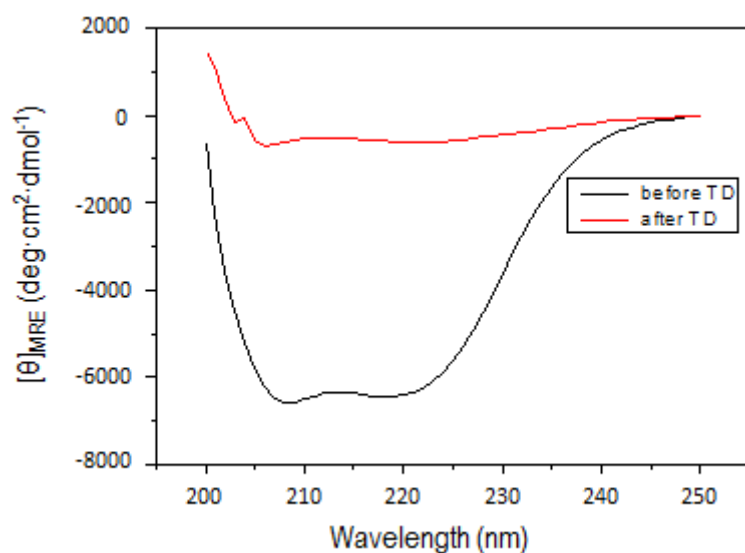
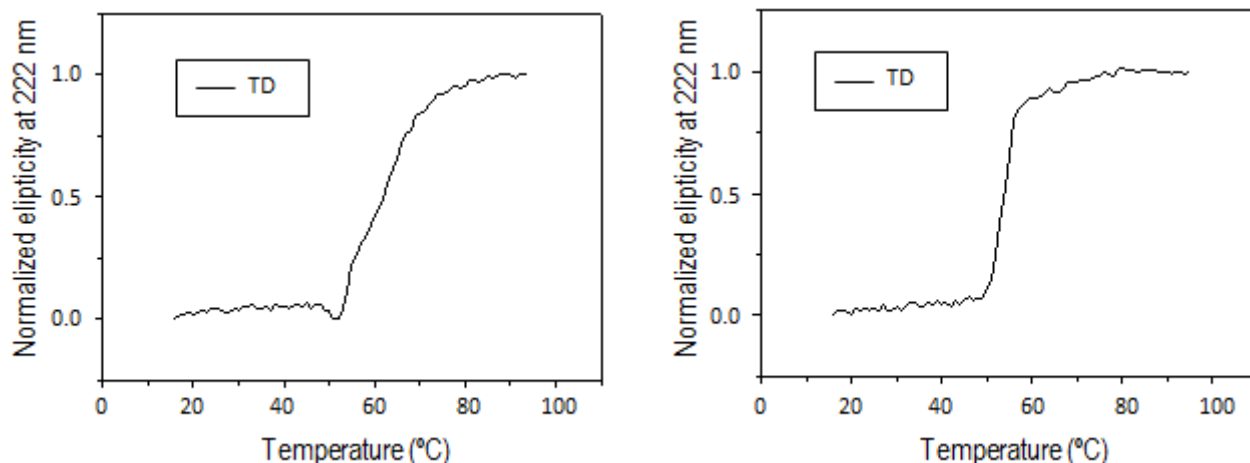


Figura 3: Espectro del fragmento CNNM4₅₄₅₋₇₇₅ (200-250 nm) a 25 °C, antes (negro) y después (rojo) de la desnaturalización térmica. El espectro realizado antes del TD muestra dos mínimos que caracterizan una abundante presencia de hélices α : uno en 208 nm y el otro en 222 nm.

El estudio de la elipticidad es valioso, especialmente para mostrar cambios en la conformación. Por ejemplo, se puede usar para estudiar cómo cambia la estructura secundaria de una molécula en función de la temperatura. En el espectro de la desnaturalización térmica (TD) del CNNM4₅₄₅₋₇₇₅ (Figura 4) se puede observar que nuestra proteína empieza a desnaturalizarse aproximadamente a 50 °C. La desnaturalización es cooperativa hasta llegar a los 75-80°C. A partir de 90 °C toda la proteína de la muestra se encuentra desnaturalizada. La T_m del CNNM4₅₄₅₋₇₇₅ se encuentra cerca de los 62 °C.

La desnaturalización térmica del CNNM4₅₄₅₋₇₃₀ se parece mucho a la del fragmento largo (Figura 5). Al igual que en el caso anterior, es una vez alcanzado los 50 °C cuando empieza a desnaturalizarse la proteína y a partir de esta temperatura la desnaturalización se da de forma cooperativa, siendo más cooperativa en el caso del fragmento corto (desnaturalización completa en el rango 60-70 °C). La T_m del fragmento CNNM4₅₄₅₋₇₃₀ está cerca de los 53 °C.

Por otra parte, con el CD se ha verificado que la proteína se encuentra en su conformación nativa antes de emprender experimentos extensos y/o costosos con ella, como es el RMN.

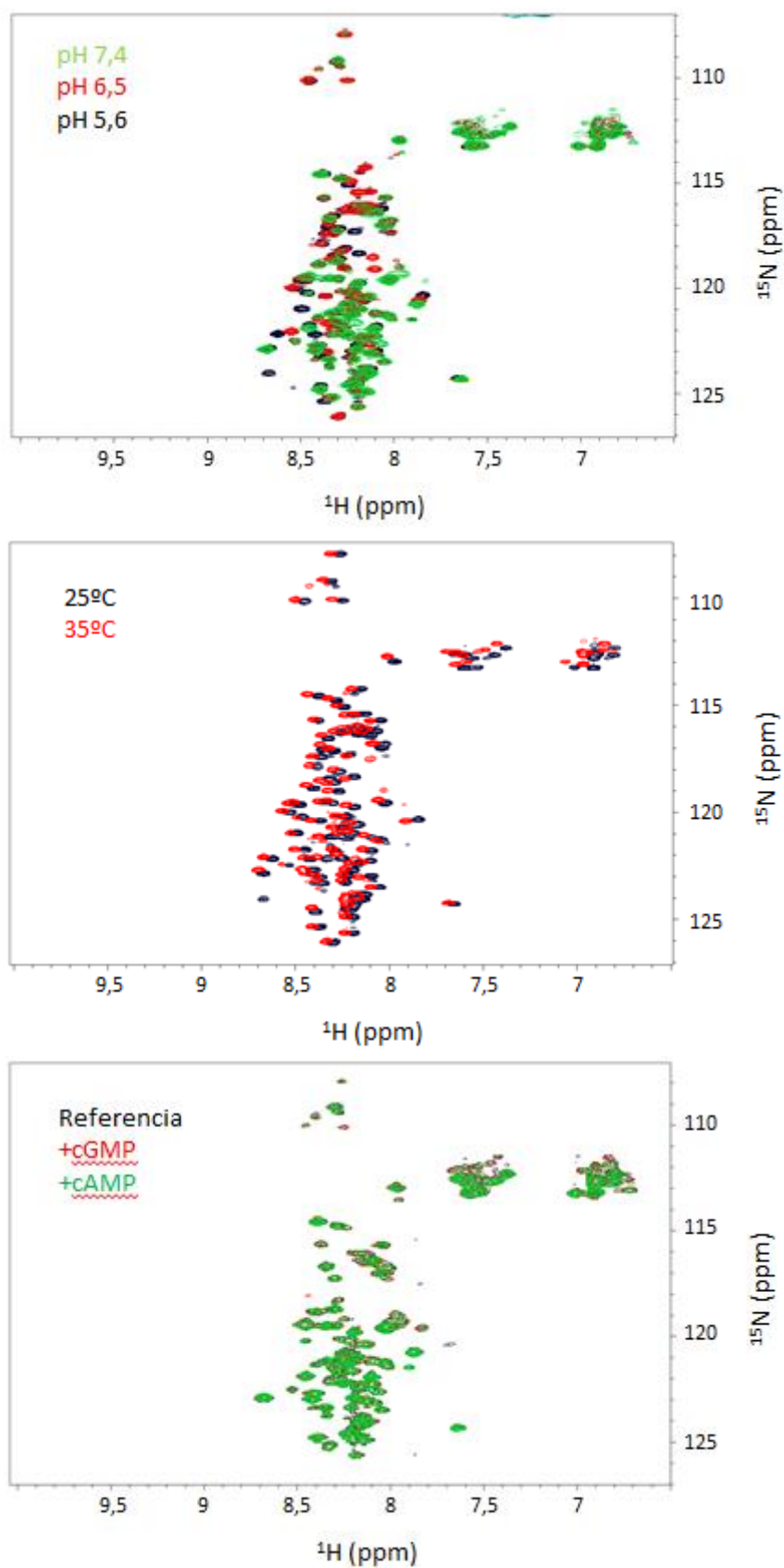


Figuras 4 (izquierda) y **5** (derecha): Espectros de la desnaturalización térmica de los fragmentos CNNM4₅₄₅₋₇₇₅ (4) y CNNM4₅₄₅₋₇₃₀ (5). Se muestra el cambio de la elipticidad a 222 nm en función de la temperatura (0-100 °C).

RMN

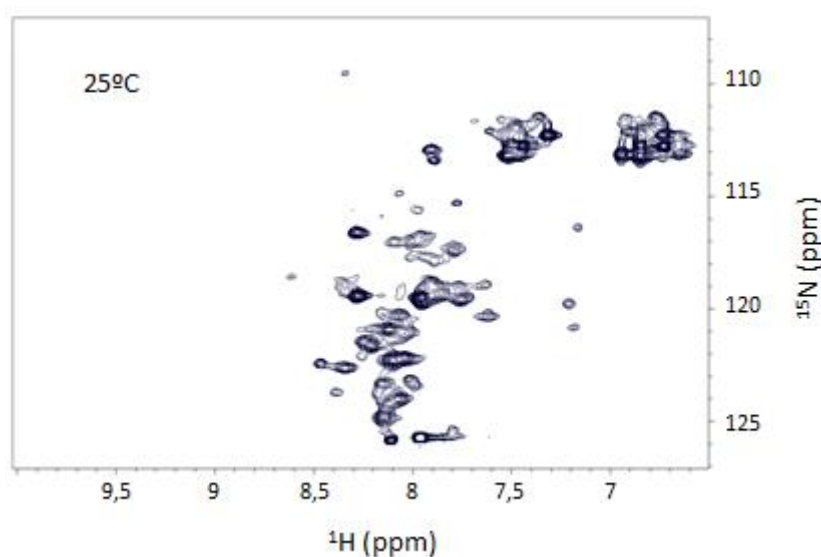
Al saber que el fragmento CNNM4₅₄₅₋₇₇₅ contiene 231 aminoácidos, se esperaba observar cerca de 231 picos en el resultado del espectro ¹H-¹⁵N-HSQC. Sorprendentemente, en la primera medición realizada a 25 °C y pH 7,4 se observaron cerca de 90 picos, muchos menos de los esperados. Además, todos los picos encontrados aparecen en un rango estrecho de frecuencias de la dimensión del protón (7,75-8.75 ppm). Con la intención de visualizar los picos que faltaban se bajó el pH a 6,5 y esta vez se observaron unos 120 picos. Al seguir bajando el pH a 5,6 se visualizaron 150 aminoácidos (*figura 6*). En cambio, al subir la temperatura a 35 °C, el espectro sigue teniendo el mismo aspecto; pero, el número de picos observados baja a 110 y estos picos aparecen desplazados al compararlos con el espectro anterior (*figura 7*).

Al comparar los espectros anteriores y posteriores a la adición de los nucleótidos, no se observó ningún cambio significativo. Por lo que, no parece que se haya producido ninguna interacción proteína-ligando. Aun así, al no observar los picos que corresponden a cada uno de los 231 aminoácidos del fragmento, no podemos decir con certeza que no se haya dado la unión.



Figuras 6 (arriba), 7 (medio) y 8 (abajo): Espectros ^1H - ^{15}N -HSQC del fragmento CNNM4₅₄₅₋₇₇₅ (80 μM) a 25°C y distintas condiciones de pH (6); a pH 5,6 y distintas condiciones de temperatura (7); y a 25°C y pH 7,4 al añadir los nucleótidos cíclicos (8).

Una vez realizado el análisis del CNNM4₅₄₅₋₇₇₅, se estudió la muestra del CNNM4₅₄₅₋₇₃₀ a pH 7,4 y 25 °C. Al conocer que el fragmento contenía 186 aminoácidos, se esperaba observar cerca de 186 picos en el espectro ¹H-¹⁵N-HSQC. En este caso, al igual que ocurría con el fragmento anterior, se observaron menos picos de los esperados en un rango estrecho de frecuencias en la dimensión de protón (7,5-8,5 ppm). Se observaron unos 57 picos, una proporción aún menor que la del fragmento largo. La calidad general del espectro ¹H-¹⁵N-HSQC obtenido de esta muestra era peor que la del fragmento largo y no se hizo ningún otro experimento sobre él.



Figuras 9: Espectro ¹H-¹⁵N-HSQC del fragmento CNNM4₅₄₅₋₇₃₀ (100 μM) a 25°C y pH 7,4.

Discusión

Antes de sumergirse en el estudio de los potenciales ligandos del dominio cNMP, se llevó a cabo un análisis estructural de la proteína. Al utilizar la herramienta SEC-MALLS se quiso estudiar el estado oligomérico de CNNM4₅₄₅₋₇₇₅ y CNNM4₅₄₅₋₇₃₀. Las masas medidas se acercaban mucho a los valores teóricos de los monómeros, indicando que las dos proteínas son monoméricas.

En estudios realizados se ha demostrado que el módulo Bateman dimeriza formando estructuras en forma de disco que sugieren un estado dimérico para la proteína *full-length* [3]. En este proyecto, se concluye que el dominio de unión a cNMP no se autoasocia de forma análoga al módulo Bateman; por lo que, al menos en ausencia del dominio transmembrana, no contribuye a la dimerización de la proteína *full-length*.

Al medir la elipticidad del CD se comprobó que la estructura secundaria del dominio cNMP, mayoritariamente, está constituida por hélices alfa. En los espectros de la desnaturalización térmica se observó una disminución de estructura secundaria de la proteína a medida que se aumentaba la temperatura, pero también una precipitación de la proteína al terminar el experimento (desnaturalización irreversible). Al comparar los espectros TD de ambos fragmentos se contempló que el fragmento corto tiene una T_m menor (53 °C) que el largo (62 °C) y la desnaturalización es más cooperativa. Estos resultados sugieren que el fragmento largo es más estable que el corto y que la hélice alfa que contiene el fragmento largo en el extremo carboxilo del dominio cNMP aumenta la estabilidad. Sin embargo, la irreversibilidad del proceso y la precipitación de ambas proteínas impiden sacar una conclusión definitiva de estas observaciones.

En todos los espectros ^1H - ^{15}N -HSQC obtenidos por RMN se observaron menos picos de los esperados. Además, los pocos picos observados aparecen en un rango estrecho de frecuencias en la dimensión de protón. Los picos obtenidos entre 7,75-8,75 ppm pertenecen a los enlaces peptídicos de la proteína, mientras que los picos observados entre 7-7,5 ppm pertenecen a las cadenas laterales de asparraguinas y glutaminas. Este aspecto de los espectros es típico de proteínas sin estructura terciaria [13].

En una proteína plegada la mayoría de los grupos NH forman enlaces de hidrógeno intramoleculares, facilitando su observación por RMN. Cuando una proteína está desplegada y expone los grupos NH al disolvente, se establecen enlaces de hidrógeno intermoleculares entre el disolvente (agua) y el grupo NH; de manera que se dificulta su detección [12]. Con el objetivo de favorecer la observación de los NH de cada uno de los aminoácidos se probaron distintas condiciones de pH y temperatura. No obstante, el aspecto del espectro sigue siendo el mismo y se logran visualizar sólo unos pocos picos nuevos. Al añadir los nucleótidos cíclicos cGMP y cAMP tampoco sucede ningún cambio significativo que demuestre la unión al ligando.

La observación de menos picos de los esperados en un espectro ^1H - ^{15}N -HSQC puede deberse también al alto grado de solapamiento de las señales, y a un comportamiento dinámico de la proteína desfavorable [12-14].

En el espectro ^1H - ^{15}N -HSQC adquirido del CNNM4₅₄₅₋₇₃₀, se observan menos picos que en el CNNM4₅₄₅₋₇₃₀. El ensanchamiento de las señales sugiere que esta diferencia se debe a que el fragmento corto tiene un comportamiento dinámico más desfavorable a la hora de observar por RMN. Esto apoya la conclusión derivada de los espectros de CD: que la hélice alfa que contiene el fragmento largo en su extremo carboxilo es importante para la estabilidad del dominio cNMP.

Frente al inesperado resultado obtenido en los experimentos de RMN, se podría pensar que la proteína analizada se ha desnaturizado durante el proceso por algún error cometido; pero, gracias a los datos del CD se puede descartar esa hipótesis. Por tanto, se deduce que el dominio cNMP no tiene estructura terciaria y que tampoco se estabiliza en presencia de los nucleótidos cíclicos cGMP y cAMP.

Conclusión

En este trabajo se concluye que el estado oligomérico del dominio cNMP en disolución es monomérico. En cuanto a la estructura secundaria, una proporción de este dominio es esencialmente helicoidal y el resto de su secuencia no presenta estructura terciaria. El dominio cNMP no interacciona con los nucleótidos cíclicos cGMP y cAMP cuando se encuentra aislado de la región transmembrana. Por último, se ha observado que la hélice alfa del extremo carboxilo contribuye a la estabilidad del dominio.

Bibliografía

1. Jahnen-Dechent, W. & Ketteler, M. (2012) Magnesium basics. *Clin. Kidney J.* **5**, i3-i14.
2. Swaminathan, R. (2003) Magnesium metabolism and its disorders. *Clin. Biochem. Rev.* **24**, 47-66.
3. Corral-Rodríguez, M. A., Stuiver, M., Abascal-Palacios, G., Diercks, T., Oyenarte, I., Ereño-Orbea, J. et al. (2014) 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.
4. Ferre, S., Hoenderop, J. G. & Bindels, R. J. (2011) Insight into renal Mg^{2+} transporters. *Curr. Opin Nephrol. Hypertens.* **20**, 169-176.
5. Hirata, Y., Funato, Y., Takano, Y. & Miki, H. (2014) Mg^{2+} -dependent interactions of ATP with the cystathionine- β -synthase (CBS) domains of a magnesium transporter. *J. Biol. Chem.* **289**, 14731-147319.

6. Stuver, M., Lainez, S., Will, C. Terry, S. Gunzel, D., Debaix H., Sommer, K et al. (2011) CNNM2, encoding a basolateral protein required for renal Mg^{2+} handling, is mutated in dominant hypomagnesemia. *Am. J. Hum. Genet.* **88**, 333-343.
7. Hirata, Y., Funato, Y. & Miki, H. (2011) Basolateral sorting of the Mg^{2+} transporter CNNM4 requires interaction with AP-1A and AP-1B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **455**, 184-189.
8. Polok, B., Escher, P., Ambresin, A., Chouery, E., Bolay, S., Meunier, I., Nan, F. et al. (2009) Mutations in CNNM4 cause recessive cone-rod dystrophy with amelogenesis imperfecta. *Am. J. Hum. Genet.* **84**, 259-265.
9. Yamazaki, D., Funato, Y., Miura, J., Sato, S., Toyosawa, S., Furutani, K., Kurachi, Y., Omori, Y., Furukawa, T., Tsuda, T. et al. (2013) Basolateral Mg^{2+} extrusion via CNNM4 mediates transcellular Mg^{2+} transport across epithelia: a mouse model. *PLoS Genet.* **9**, e1003983.
10. Funato, Y., Yamazaki D., Mizukami S., Du, L., Kikuchi, K. & Miki, H. (2014) Membrane protein CNNM4-dependent Mg^{2+} efflux suppresses tumor progression. *Clin. Invest.* **124**, 5398-5410.
11. Hardy, S., Uetani, N., Wong, N., Kostantin, E., Labbé, D. P., Bégin, L. R. et al. (2015) The protein tyrosine phosphatase PRL-2 interacts with the magnesium transporter CNNM3 to promote oncogenesis. *Oncogen* **19**, 986-95.
12. Marion, D. (2013) An introduction to biological NMR spectroscopy. MCP Papers. Manuscript O113.030239.
13. Kwan, A. H., Mobli, M., Gooley, P. R., King, G. F. & Mackay, J. P. (2011) Macromolecular NMR spectroscopy for the non-spectroscopist. *FEBS Journal* **278**, 687-703.
14. Uversky, V. N. & Dunker, A. K. (2010) Understanding Protein Non-Folding. *Biochim Biophys Acta* **1806**, 1231-1264.