

Mutaciones del receptor de LDL que permiten considerar la hipercolesterolemia familiar dentro de las enfermedades del plegamiento de las proteínas

C. Machicado, S. Castillo, M. Bueno, M. Pocoví y J. Sancho

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Facultad de Ciencias. Universidad de Zaragoza. Zaragoza. España.

Fundamento. La hipercolesterolemia familiar (HF) es una hiperlipidemia autosómica dominante asociada a defectos en el receptor de LDL (rLDL). La reciente determinación de la estructura tridimensional de parte de sus dominios permite investigar las causas moleculares de la HF. En particular, el rLDL presenta 7 módulos LA que unen las LDL. La estructura de los módulos LA se estabiliza mediante interacciones cuya integridad resulta crítica para preservar la función.

Métodos. Utilizando el programa MultiAlign y las secuencias de los módulos LA depositadas en el Protein Data Bank (PDB) se han analizado, desde el punto de vista estructural, las mutaciones del rLDL encontradas en pacientes españoles.

Resultados. Las mutaciones localizadas en los módulos LA (18 mutaciones distintas) conducen en la mayor parte de los casos (89%) a una desestabilización drástica del receptor. Las mutaciones con probable defecto estructural se clasifican en 3 grupos: *a)* mutaciones en cisteínas, consistentes en 7 mutaciones distintas que afectan a los 3 puentes disulfuro de los módulos LA. Los módulos LA pertenecen a la categoría de pequeñas proteínas estabilizadas por puentes disulfuro; *b)* mutaciones en los residuos ácidos de unión a Ca^{2+} , con 6 mutaciones distintas que afectan a dos de los 4 residuos implicados en la unión del metal. La correcta unión de Ca^{2+} es necesaria para aliviar la

repulsión electrostática de los 4 grupos ácidos que confluyen en esta zona del módulo, y *c)* mutaciones de los residuos que enlazan la horquilla beta con el resto del módulo, constituidas por 3 mutaciones distintas que afectan a los dos residuos implicados en la orientación de la horquilla beta.

Conclusiones. El análisis estructural indica que estas mutaciones producen una desestabilización de la proteína. Si este hecho se confirma, podemos anticipar la conveniencia de desarrollar una nueva familia de fármacos hipolipemiantes que consista en ligandos que se unan a los módulos LA mal plegados (en zonas que no interfieran con su unión a LDL) rescatando su conformación nativa funcional.

Palabras clave:
Hipercolesterolemia familiar. Plegamiento de proteínas. Conformación nativa.

LDL-RECEPTOR MUTATIONS ALLOWING FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA TO BE CONSIDERED AS A PROTEIN-FOLDING DISEASE

Background. Familial hypercholesterolemia (FH) is an autosomic and dominant hyperlipidemia associated to defects in the LDL-receptor (LDL-r). The recent and partial determination of the tridimensional structure of LDL-r domains allows to research the FH molecular basis. Particularly, LDL-r presents seven LA modules which bind LDL particles. The structure of LA modules is stabilised by means of interactions whose integrity is essential for keeping the function.

Correspondencia: Dr. J. Sancho.
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular.
Facultad de Ciencias. Universidad de Zaragoza.
Pedro Cerbuna, 12. 50009 Zaragoza. España.
Correo electrónico: jsancho@posta.unizar.es

Methods. Mutations in the LDL-r from spanish patients have been analysed from the structural and energetic point of view. We have used the MultiAlign, InsightII and WebLab programs and the sequences of LA modules deposited in Protein Data Bank (PDB).

Results. In most of cases (89%), the mutations located in LA modules (18 different mutations) lead to a drastic destabilization of LDL-r. Mutations relating to probable structural effects are classified in 3 groups: *a)* mutations in cisteins: 7 different mutations that modify 3 disulphide bonds in LA modules. LA modules pertain to a small category of proteins stabilised by disulphur bonds; *b)* mutations in acidic Ca²⁺-binding residues: 6 different mutations that affect to 2 of 4 residues involved in Ca²⁺ binding. The correct Ca²⁺ binding is needed for alleviating the electrostatic repulsion of four acidic groups which are located in this region of the LA module, and *c)* mutations of residues that link the beta hairpin to the rest of the LA module: 3 different mutations that affect to 2 residues involved in the orientation of the beta hairpin.

Conclusions. The structural analysis indicates that these mutations produce an LDL-r destabilisation. If this fact is confirmed, we could anticipate the interest of developing a new family of pharmacologic molecules consisting of ligand binders to misfolded LA modules (at regions where none interference to LDL binding occurs) so rescuing their native functional conformation.

Key words:
Familial hypercholesterolemia. Protein folding.
Native conformation.

Introducción

Muchas enfermedades agrupan en realidad fenotipos parecidos que están originados por defectos genéticos diversos. Para poder ofrecer tratamientos específicos de mayor eficacia, resulta esencial comprender las causas moleculares que subyacen en cada paciente. Un ejemplo notable lo constituye la hipercolesterolemia familiar (HF), trastorno del metabolismo lipídico de transmisión autosómica dominante que afecta al metabolismo de las lipo-proteínas de baja densidad (LDL).

Las LDL son los principales transportadores de colesterol en la sangre y sus concentraciones plasmáticas son controladas por un receptor específico (rLDL) que las retira de la circulación¹. El defecto genético responsable de la HF está localizado en el rLDL, proteína de membrana cuyo gen se encuen-

tra en el cromosoma 19, el cual consta de 18 exones y 17 intrones y se extiende a lo largo de 45 Kb¹. El rLDL es un polipéptido de 839 aminoácidos organizado en varios dominios (fig. 1). En el extremo amino terminal se localizan 7 módulos ricos en cisteína (LA), de unos 40 aminoácidos cada uno, que constituyen la región de unión a las LDL. A continuación, dos dominios homólogos al factor de crecimiento epidérmico (EGF) preceden a 6 dominios YWTD (Y), implicados en la liberación de las LDL a pH ácido, a los que sigue una tercera repetición EGF. Despues, aparecen sucesivamente un segmento glucosilado, un dominio transmembrana y, para terminar, una cola citoplásmica que constituye el extremo carboxilo terminal del receptor. Se conocen en la actualidad más de 600 mutaciones de rLDL en humanos, asociadas a la hipercolesterolemia familiar². Las mutaciones pueden afectar, según los casos, a la unión de LDL, a su liberación, a la endocitosis del receptor, a su plegamiento o a su transporte a través de la vía secretora hasta la superficie celular³. En realidad, para la mayor parte de las mutaciones detectadas en humanos se ignora el proceso que está perturbado y, aun en los casos mejor estudiados, la razón molecular del defecto dista de estar aclarada.

Afortunadamente, en los últimos años se ha empezado a disponer de información estructural precisa de varios de los dominios que constituyen el rLDL (fig. 2). Así, se han determinado las estructuras tridimensionales de los módulos LA1 y LA2 (juntos y por separado)^{4,6}, LA5 y LA6 (juntos y por separado)^{7,9}, de los dos primeros dominios EGF¹⁰ y del dominio formado por las 6 repeticiones YWTD (unido al tercer dominio EGF)¹¹. El objetivo del presente trabajo es establecer las bases estructurales de las mutaciones en los dominios de LA del rLDL que disminuyen su afinidad por las partículas de LDL. Por ello, las estructuras tridimensionales ofrecen una base sólida para la comprensión de los defectos moleculares asociados con las mutaciones que producen HF y, a partir de ahí, para el diseño o identificación de fármacos específicos.

Materiales y método

Recopilación de las mutaciones en los módulos LA

El procedimiento detallado para detectar mutaciones en la región del gen del rLDL que codifica los módulos LA, en pacientes con diagnóstico clínico de HF, según los criterios del MedPed, ha sido descrito anteriormente por Mozais¹². En resumen, se lleva a cabo la amplificación de los exones 2-6 por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y los correspondientes nexos exón-intrón, utilizando cebadores marcados con el fluoroforo Cy5. Los fragmentos amplificados se

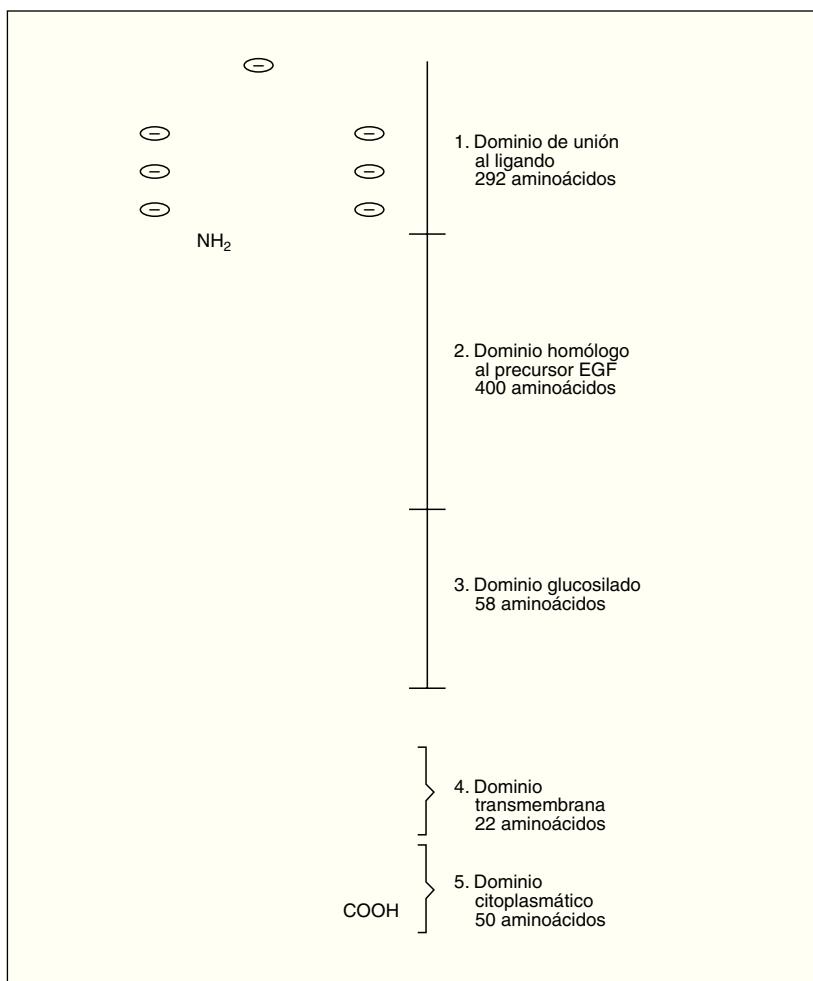


Figura 1. Esquema con los distintos dominios del receptor de LDL. Adaptada de Brown et al²⁵.

analizaron por la técnica de detección de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP) en geles con y sin glicerol y a distintas temperaturas. Aquellos fragmentos con patrones de SSCP anómalos se secuenciaron para identificar la mutación responsable de dicha anormalidad, comprobándose posteriormente por análisis de restricción.

Conservación de residuos en los módulos LA

Se obtuvieron las secuencias de los 7 módulos LA del Protein Data Bank (PDB; <http://pdb.rcsb.org/pdb/>). Posteriormente se alinearon empleando el programa MultiAlign y analizaron los residuos conservados.

Obtención de la estructura tridimensional de los módulos LA

Se obtuvieron las estructuras tridimensionales de los módulos LA del PDB. Los módulos LA-2 (código PDB 1LDR; ref. 13) y LA6 (código PDB 1D2J; ref. 9) están resueltos por la técnica de resonancia magnética nuclear (RMN). En tanto que el módulo LA5 (código PDB 1AJJ; ref. 8) se ha resuelto por la técnica de difracción de rayos X. Se obtuvo también la estructura de los módulos LA1-LA2 en complejo, resueltas por RMN (1F5Y; ref. 4).

Análisis estructural de las mutaciones en los módulos LA

Hemos empleado dos programas bioinformáticos; InsightII (Accelrys Inc.) y WebLab (Accelrys Inc.) para la visualización de las estructuras tridimensionales de los distintos módulos. La ubicación de las posiciones donde ocurren las mutaciones se llevó a cabo por inspección visual de las estructuras. Para analizar el efecto de las distintas mutaciones se efectuaron los cambios de aminoácidos sobre las estructuras del módulo respectivo, empleando el programa SwissPDBViewer (GlaxoSmithKline R&D Geneva). Al hacer la mutación se eligió el rotámero más favorable de ese residuo.

Cálculo de la superficie de potencial electrostático

El cálculo de superficie potencial electrostática se realizó con el software WebLab (Accelrys Inc.). Se calculó la superficie de potencial electrostático empleando una sonda de 1,4 nm de radio sobre las estructuras tridimensionales de cada módulo LA. Para analizar los cambios provocados por una mutación, se efectuó la mutación virtual como se indica en la sección anterior y se calculó la superficie de potencial electrostático para cada estructura mutada.

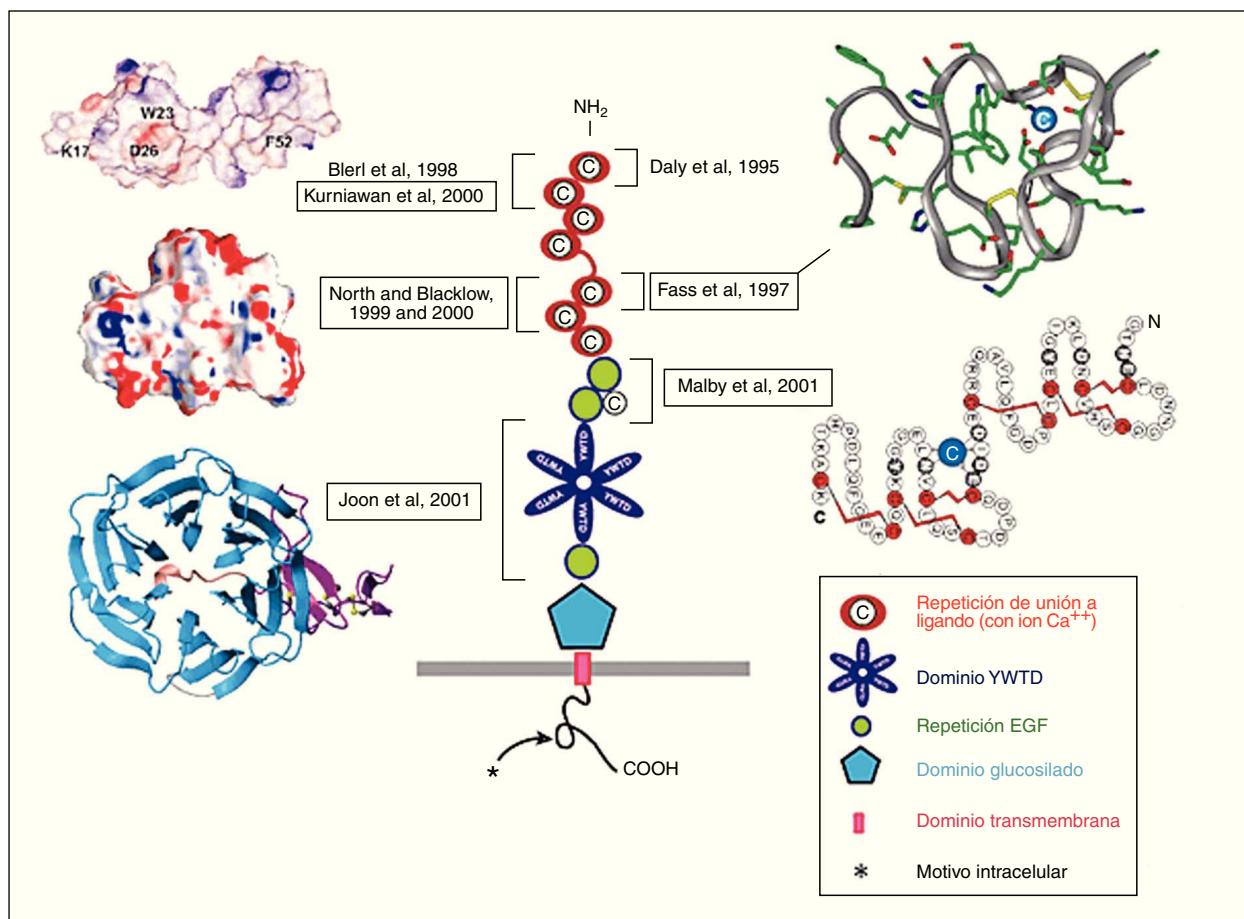


Figura 2. Regiones del receptor de LDL cuya estructura tridimensional es conocida. Adaptada de Herz³.

Resultados

Recopilación de las mutaciones en los módulos LA

Se han analizado las mutaciones en el rLDL que afectan a los módulos LA descritas en la población española¹⁴⁻¹⁶. Del análisis inicial de las mutaciones encontradas (tabla 1) se desprende que los defectos en el mecanismo de retirada de colesterol del plasma que tienen lugar en cada paciente pueden ser diversos, lo que contribuiría a explicar en parte el distinto efecto que los fármacos hipolipemiantes utilizados para tratar la HF producen en distintos grupos de pacientes.

Conservación de residuos en los módulos LA

El alineamiento de secuencia de los 7 módulos LA demuestra la conservación de los 6 residuos de cisteína que forman los puentes disulfuro intramoleculares. Así mismo, hay una región muy conservada al final de los 7 módulos con secuencia SDE que se mantiene en todos los módulos (fig. 3). Cabe

resaltar que en todos los dominios se conservan, en la región de unión a Ca^{2+} , residuos muy ácidos (Asp o Glu).

Análisis estructural de las mutaciones en los módulos LA

De los 7 módulos LA, homólogos entre sí (fig. 1), se conoce la estructura de cuatro. Todos ellos contienen 3 puentes disulfuro, un sitio de unión de Ca^{2+} rico en aminoácidos ácidos y un núcleo hidrofóbico exiguo. Estructuralmente comparten un plegamiento muy similar, con un sitio de unión a Ca^{2+} interno, el cual es coordinado por 6 grupos funcionales: 4 carboxilos provenientes de residuos como Asp o Glu y 2 carbonilos de otros dos residuos de aminoácidos cercanos al sitio de unión.

La localización de las mutaciones encontradas en España¹⁴⁻¹⁶ se extiende en toda la estructura de los dominios. Hemos agrupado las mutaciones en tres tipos, según el efecto que producirían en la proteína. El primer grupo corresponde a mutacio-

nes de residuos Cys que afectan a los puentes disulfuro. El segundo grupo son mutaciones en residuos del sitio de unión a Ca^{2+} , que afectarían directamente la unión de dicho elemento y, en consecuencia, al plegamiento del dominio. Por último, un tercer grupo de mutaciones corresponde a aquellas que modifican algún puente de hidrógeno intramolecular que podría causar una desestabilización local del dominio.

Cálculo de la superficie de potencial electrostático

El análisis de la superficie de potencial electrostático en las estructuras de los módulos LA revela una zona muy ácida (carga negativa) hacia el extremo carboxilo terminal correspondiente al sitio de unión a Ca^{2+} . Este carácter ácido se observa por igual en todos los módulos analizados. Hemos observado que las mutaciones ubicadas en el sitio de unión a Ca^{2+} (mutaciones en residuos de Asp o Glu) modifican el potencial electrostático. En algunos casos disminuyen su carácter ácido, volviéndolo neutro (mutaciones de Asp por Tyr, Ala, o Gly). En otros casos, el cambio de un residuo ácido como Glu por uno básico Lys introduce en esta región en carga neta positiva.

La alteración del carácter ácido del sitio de unión a Ca^{2+} podría repercutir no sólo en la unión de Ca^{2+} y el plegamiento del módulo, sino también en la unión de LDL, que se cree que ocurre en esta región por su complementariedad de carga con las hélices básicas de la apoliproteína B (apo B) contenida en las LDL.

Discusión

La moderada homología de secuencia de los 7 módulos LA se traduce en una alta homología es-

Tabla 1. Mutaciones halladas en los módulos LA

Mutación*	Módulo	Estructura	Código PDB
C89W	2	RMN	1LDR
C95G	2	RMN	1LDR
Q92E	2	RMN	1LDR
C116R	3	—	—
C134W	3	—	—
E140K	3	—	—
D172N	4	—	—
D175N	4	—	—
S177L	4	—	—
P181R	4	—	—
C216R	5	Rayos X	1. ^a JJ
D221Y	5	Rayos X	1. ^a JJ
D221G	5	Rayos X	1. ^a JJ
S226P	5	Rayos X	1. ^a JJ
E228K	5	Rayos X	1. ^a JJ
E246A	6	RMN	1D2J
C276G	7	—	—
E277K	7	—	—
D301G	7	—	—

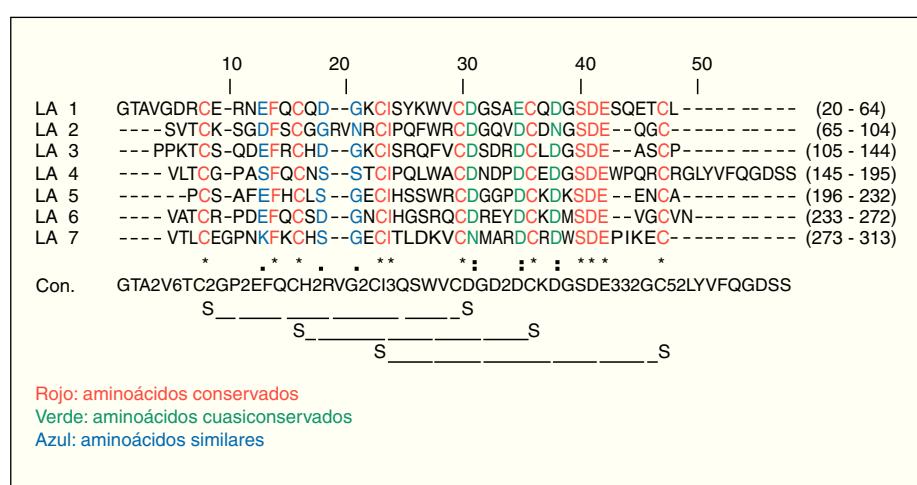
*Numeración de aminoácidos sin considerar el péptido señal.

Código PDB: código PDB de la estructura.

tructural. Existen evidencias de que cada módulo constituye una unidad de plegamiento autónoma que no interactúa con los otros módulos^{7,17}. Para que los módulos sean funcionales es esencial que estén correctamente plegados, y se han descrito mutaciones que desestabilizan los módulos haciéndoles perder su estructura nativa^{18,19}. De forma semejante, diversas enfermedades, como la fibrosis quística, la deficiencia de alfa-1-antitripsina, la retinosis pigmentosa, el síndrome de Marfan y el cáncer^{20,21}, han sido relacionadas con pérdidas de funcionalidad asociadas a bajas estabilidades conformacionales de diversas proteínas con mutaciones.

En cuanto a la unión de las LDL y el receptor, la importancia de determinados residuos básicos de la

Figura 3. Alineamiento de las secuencias de los módulos LA1-LA7 definidos a partir de las secuencias de las estructuras tridimensionales resueltas. El alineamiento se ha realizado con Multialign. Se resaltan en negrita las posiciones en que aparecen mutaciones en pacientes españoles con hipercolesterolemia familiar.



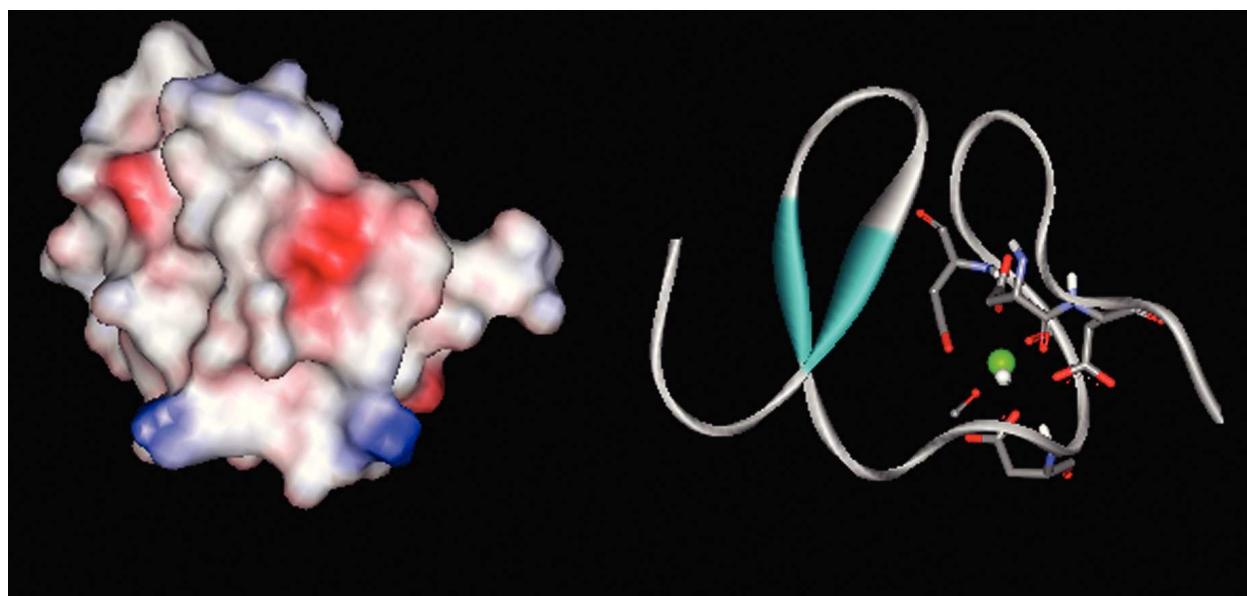


Figura 4. Izqda.: la superficie de potencial electrostático del módulo LA5 del rLDL humano (rojo es potencial negativo y azul positivo) calculada con WebLab a partir de las coordenadas del fichero 1AJJ del Protein Data Bank. Dcha.: los cuatro residuos acídicos y los dos carbonilos de la cadena principal que coordinan el Ca^{2+} vistos en la misma orientación que el mapa de potencial electrostático. La mancha de potencial negativo coincide con la región de unión de Ca^{2+} .

apo B de las LDL para la interacción con el rLDL²² ha llevado a considerar que fueran residuos ácidos de los módulos LA los responsables del reconocimiento de apo B y, por tanto, de la unión a LDL. En este sentido, la región acídica carboxiterminal de los módulos LA se postuló como un interesante candidato para constituir el lugar de reconocimiento de las LDL²³. Sin embargo, al descubrir que dicha región acida constituye el sitio de unión a Ca^{2+} y que, además, es importante para el correcto plegamiento de los módulos LA, su papel como sitio de unión de LDL se ha puesto en entredicho¹⁸. A pesar de esto, la superficie de potencial electrostático de los módulos LA (fig. 4) demuestra claramente que el sitio de unión de Ca^{2+} (en el que confluyen 4 grupos ácidos) constituye, destacadamente, la zona de potencial más negativo de todo el módulo, por lo que no debería descartarse que estos grupos ácidos desempeñen un doble papel de ligandos del ion calcio y de ligandos de la apo B.

En este momento, en relación a la estructura del rLDL, numerosas preguntas clave siguen sin respuesta. Así, no se conocen los aminoácidos que reconocen a la apo B, no se sabe cómo cooperan los distintos módulos LA en la unión de apo B y, salvo en contados casos, se desconoce qué residuos son esenciales para mantener el correcto plegamiento de los módulos LA compatible con su función. Si el carácter desestabilizador de las mutaciones detec-

tadas se confirma, podemos anticipar la conveniencia de desarrollar una nueva familia de fármacos hipolipemiantes que consista en ligandos que se unan a los módulos LA mal plegados (en zonas que no interfieran con su unión a LDL), rescatando su conformación nativa funcional. El estudio de Foster et al (1999)²⁴ demostró que es factible el diseño de compuestos que estabilizan un dominio nativo de unión a ADN de la proteína p53 capaz de activar la transcripción, retardando así el crecimiento tumoral.

En un futuro próximo, para contribuir a resolver los interrogantes que hemos planteado, es necesario realizar un análisis estructural, energético y funcional de varios módulos LA que albergan mutaciones causantes de HF. La consecución de los objetivos planteados será crucial para la comprensión molecular del mecanismo de retirada de colesterol del plasma sanguíneo y para facilitar el diseño de nuevos fármacos específicos para las necesidades de distintos grupos de pacientes actualmente agrupados por presentar un fenotipo similar.

Bibliografía

1. Brown M, Goldstein J. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986;232:34-47.
2. Goldstein J, Hobbs H, Brown M. Chapter 120. En: Scriver CR, Beaudet LA, Sly ws, Valle D, editors. *Metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill Publishing Company, 2001; p. 2863-913.

3. Herz J. Deconstructing the LDL receptor-a rhapsody in pieces. *Nature Struct Biol* 2001;8:476-8.
4. Kurniawan N, Atkins A, Bieri S, Brown C, Brereton I, Kroon P, et al. NMR structure of a concatemer of the first and second ligand-binding modules of the human low-density lipoprotein receptor. *Protein Sci* 2000;9:1282-93.
5. Daly NL, Scanlon MJ, Djordjevic JT, Kroon PA, Smith R. Three-dimensional structure of a cysteine-rich repeat from the low-density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:6334-8.
6. Daly NL, Djordjevic JT, Kroon PA, Smith R. Three-dimensional structure of the second cysteine-rich repeat from the human low-density lipoprotein receptor. *Biochemistry* 1995;34:14474-81.
7. North CL, Blacklow SC. Structural independence of ligand-binding modules five and six of the LDL receptor. *Biochemistry* 1999;38:3926-35.
8. Fass D, Blacklow S, Kim PS, Berger JM. Molecular basis of familial hypercholesterolemia from structure of LDL receptor module. *Nature* 1997;388:691-3.
9. North CL, Blacklow SC. Solution structure of the sixth LDL-A module of the LDL receptor. *Biochemistry* 2000;39:2564-71.
10. Malby S, Pickering R, Saha S, Smallridge R, Linse S, Downing AK. The first epidermal growth factor-like domain of the low-density lipoprotein receptor contains a noncanonical calcium binding site. *Biochemistry* 2001;40:2555-63.
11. Jeon H, Meng W, Takagi J, Eck MJ, Springer TA, Blacklow SC. Implications for familial hypercholesterolemia from the structure of the LDL receptor YWTD-EGF domain pair. *Nature Struct Biol* 2001;8:499-504.
12. Mozas P. Mutaciones en el gen del receptor de lipoproteínas de baja densidad asociadas con hipercolesterolemia. Factores genéticos relacionados con el riesgo de enfermedad cardiovascular [tesis doctoral]. Zaragoza: Universidad de Zaragoza, 2000.
13. Daly N, Djordjevic J, Kroon P, Smith R. Three-dimensional structure of the second cysteine-rich repeat from the human low-density lipoprotein receptor. *Biochemistry* 1995;34:14474-81.
14. Cenarro A, Jensen HK, Casao E, Civeira F, González-Bonillo J, Rodríguez-Rey JC, et al. Identification of recurrent and novel mutations in the LDL receptor gene in Spanish patients with familial hypercholesterolemia. *Human Mutation* 1998;11:413.
15. García-García AB, Real JT, Puig O, Cebolla E, Marin-García P, Martínez Ferrandis JI, et al. Molecular genetics of familial hypercholesterolemia in Spain: ten novel LDLR mutations and population analysis. *Human Mutat* 2001;18:458-9.
16. Mozas P, Cenarro A, Civeira F, Castillo S, Ros E, Pocovi M. Mutation analysis in 36 unrelated Spanish subjects with familial hypercholesterolemia: identification of 3 novel mutations in the LDL receptor gene. *Human Mutation* 2000;15:483-4.
17. Bieri S, Atkins AR, Lee HT, Winzor DJ, Smith R, Kroon PA. Folding, calcium binding, and structural characterization of a concatemer of the first and second ligand-binding modules of the low-density lipoprotein receptor. *Biochemistry* 1998;37:10994-102.
18. Blacklow SC, Kim PS. Protein folding and calcium binding defects arising from familial hypercholesterolemia mutations of the LDL receptor. *Nature Struct Biol* 1996;3:758-62.
19. North CL, Blacklow SC. Evidence that familial hypercholesterolemia mutations of the LDL receptor cause limited local misfolding in an LDL-A module pair. *Biochemistry* 2000;39:13127-35.
20. Thomas PJ, Qu BH, Pedersen PL. Defective protein folding as a basis of human disease. *Trends Biochem Sci* 1995;11:456-9.
21. Bullock AN, Henckel J, DeDecker BS, Johnson CM, Nikolova PV, Proctor MR, et al. Thermodynamic stability of wild-type and mutant p53 core domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:14338-42.
22. Borén J, Lee I, Zhu W, Arnold K, Taylor S, Innerarity TL. Identification of the low density lipoprotein receptor-binding site in apolipoprotein B100 and the modulation of its binding activity by the carboxyl terminus in familial defective apo-B100. *J Clin Invest* 1998;101:1084-93.
23. Wilson C, Wardell MR, Weisgraber KH, Mahley RW, Agard DA. Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of human apolipoprotein E. *Science* 1991;252:1817-22.
24. Foster BA, Coffey HA, Morin MJ, Rastinejad F. Pharmacological rescue of mutant p53 conformation and function. *Science* 1999;286:2507-10.
25. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. Nobel lecture, 1985. Department of Molecular Genetics, University of Texas Health Science Center, Southwestern Medical School, 5323 Harry Hines Blvd. Dallas, Texas, EE.UU.