

Estudis estructurals i enzimàtics de la Uroporfirinogen III Sintasa humana. Bases moleculars de la Porfíria Eritropoiètica Congènita

Arola Fortian Bernabeu

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

I. Introducció

ÍNDIX

I.1. La biosíntesi del grup hemo.....	7
I. 2. La família de les porfíries.....	10
I.2.1. Tipus de porfíries.....	10
I.2.2. Síntomes, diagnòstic i tractament.....	11
I.3. La Porfíria Eritropoiètica Congènita (PEC).....	14
I.3.1. Particularitats de la malaltia.....	14
I.3.2. Mutants patogènics descrits fins al moment.....	15
I.4. L'enzim uroporfirinogen III sintasa.....	17
I.4.1. Antecedents estructurals i en solució.....	17
I.4.2. Mecanisme catalític de l'enzim.....	20
I.4.2.1. Breu introducció a la RMN.....	21
I.4.3. Possibles efectes de la mutació: pèrdua en l'activitat catalítica i pèrdua d'estabilitat.....	22
I.4.4. Estabilitat cinètica de les proteïnes en el context de les malalties estructurals.....	23
I.5. Activitat U3S en el context de la cèl·lula.....	25
I.5.1. Mecanisme catalític <i>in vivo</i>	25
I.5.2. Localització de l'enzim i transport. Tècniques de monitoratge <i>in vivo</i>	25
BIBLIOGRAFIA CAPÍTOL I.....	27

I.1. LA BIOSÍNTESI DEL GRUP HEMO

El grup hemo és un component essencial dels éssers vius. Està constituït per un anell heterocíclic format per quatre molècules de pirrol enllaçades, conegut com a protoporfirina IX, en el centre de la qual es troba un àtom de ferro. Tal com es mostra a la Figura I.1., els anells de pirrol estan units per enllaços metens (-CH=) generant un sistema de doble enllaços conjugats on els electrons poden ser compartits al llarg de l'anell. Aquesta estructura dona al grup hemo la capacitat no només d'absorbir fotons, sinó d'acomodar electrons addicionals sense patir grans alteracions.

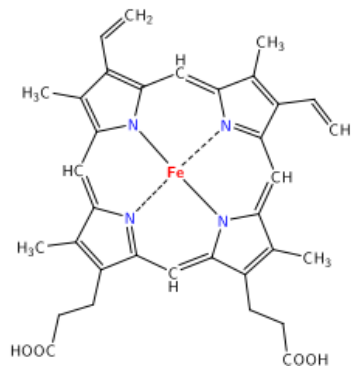


Figura I.1. Representació esquemàtica del grup prostètic hemo.

Unes de les principals funcions biològiques associades al grup hemo són les reaccions d'oxidació-reducció, on té lloc la transferència d'electrons d'un substrat a un altre. Un exemple d'aquest tipus de reacció és el cas citocrom c, un dels components més importants en el sistema de transport d'electrons associats a membrana, i que es troba tant a mitocondris, com a bacteris, com a la fotosíntesi. El grup hemo també actua de grup prostètic en proteïnes com la mioglobina i l'hemoglobina, jugant un paper imprescindible en el transport d'oxigen a les cèl·lules. A més, la protoporfirina IX, que acabarà donant lloc al grup hemo en unir-se amb el ferro, forma part de ficobilines, clorofil·les i bacterioclorofil·les, entre d'altres.

La síntesi del grup hemo té lloc tant en plantes, com en animals com en microorganismes, i inclou tres processos diferenciats: la síntesi d'un compost pirròlic substituït, el porfobilinogen, a partir de l'àcid δ-aminolevulínic, o ALA; la condensació de quatre molècules de porfobilinogen per donar lloc a un precursor parcialment reduït denominat porfirinogen, i per últim, la modificació de les cadenes laterals, la deshidrogenació de l'anell tetrapirròlic i incorporació del ferro.

En animals, el primer pas de la biosíntesi del grup hemo és la condensació del succinil-CoA amb glicina (veure figura i.2), seguit d'una descarboxilació per formar el δ-aminolevulinat (ALA). Aquesta reacció està catalitzada per la δ-aminolevulinat sintasa (ALAS), enzim dependent de piridoxal-5'-fosfat (PLP). La posterior condensació de dues molècules d'ALA condueix a la

formació de l'anell de pirrol (el porfobilinogen o PBG). La porfobilinogen sintasa (PBGS) catalitza aquesta reacció; la inhibició d'aquest enzim per plom és un dels majors efectes que té aquest metall sobre l'organisme. Quan això passa té lloc l'acumulació d'ALA, i s'ha vist que és una de les causes de psicosis produïda per plom, degut a la seva semblança amb el neurotransmissor γ -aminobutíric.^{1, 2}

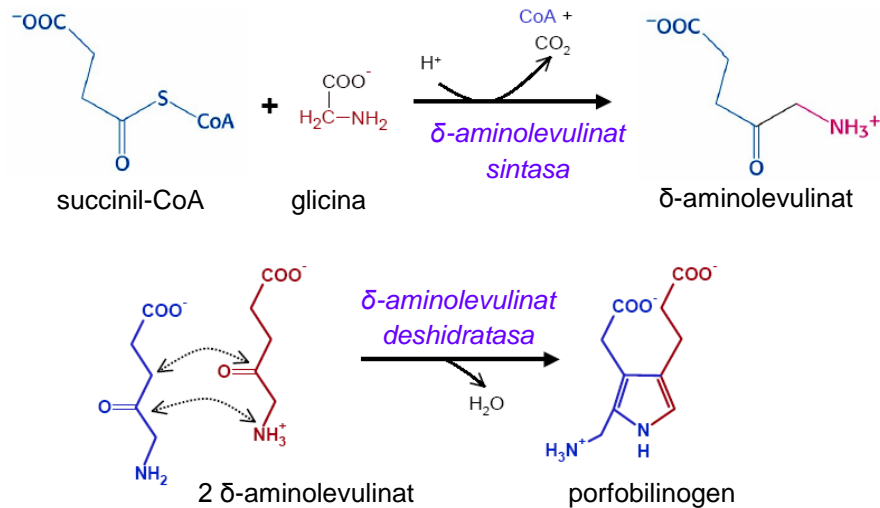


Figura I.2. Biosíntesis del PBG a partir de succinil-CoA i glicina.³ CoA: Coenzim A.

La porfobilinogen desaminasa (PBGD) catalitza la condensació de 4 grups de PBG, donant lloc al preuroporfirinogen, o hidroximetilbilà (HMB), substrat de l'enzim uroporfirinogen III sintasa, o U3S (figura i.3). La U3S catalitza la ciclació del polipirrol uroporfirinogen III implicant la inversió de configuració en un dels anells (Figura I.3). En absència de U3S el tetrapirrol lineal cicla espontàniament donant lloc a l'isòmer uroporfirinogen I. Aquesta molècula no pot evolucionar cap a grup prostètic i s'acumula en teixits.

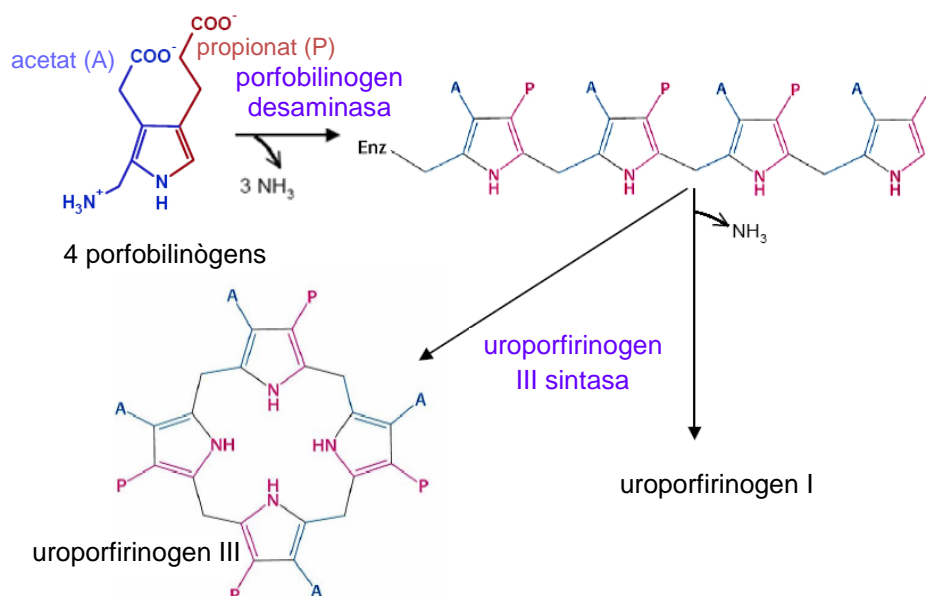


Figura I.3. Biosíntesi d'uroporfirinogen III a partir de PBG.³ Enz: enzim PBGD.

La biosíntesi del grup hemo té lloc a diferents orgànuls cel·lulars: l'ALA es sintetitza en el mitocondri i es transporta posteriorment al citosol per a la seva conversió a PBG i després a uroporfirinogen III. Una sèrie de reaccions catalitzades per la uroporfirinogen descarboxilasa, coproporfirinogen oxidasa i la protoporfirinogen oxidasa, converteixen l'uroporfirinogen III en la protoporfirina IX (figura i.4), que és convertida a grup hemo per la inserció de Fe^{2+} en el nucli tetrapirròlic gràcies a l'enzim ferroquelatasa. Durant la reacció de la coproporfirinogen oxidasa, el macrocicle es transporta al mitocondri perquè tinguin lloc les reaccions finals.

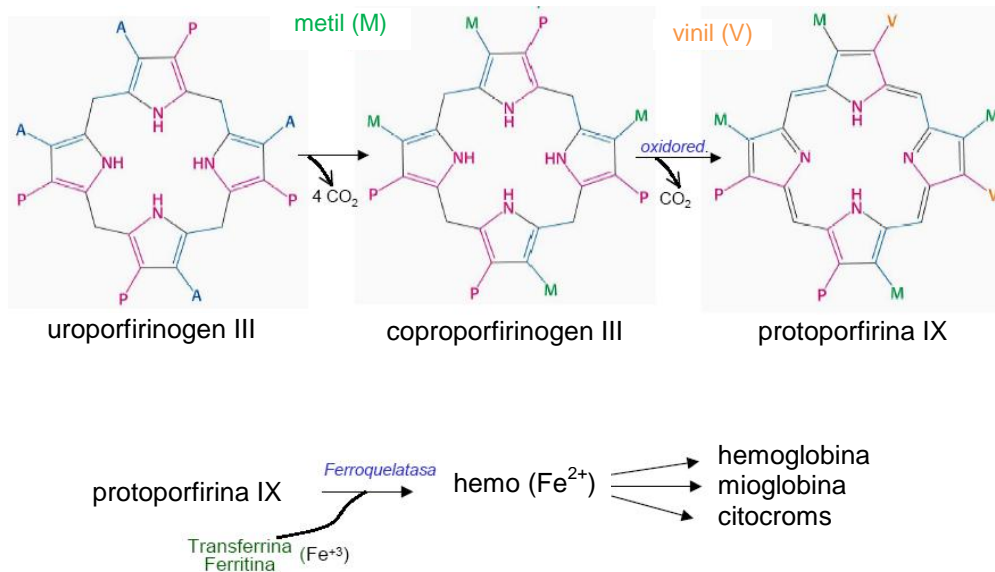


Figura I.4. Esquema de la síntesi del grup hemo a partir de l'uroporfirinogen III.³

El grup hemo es sintetitza principalment en els eritròcits (aproximadament un 85%) i en el fetge (aproximadament un 15%). El grup hemo hepàtic passa a formar part del citocrom P_{450} , un enzim oxidatiu que participa en l'eliminació de xenobiòtics (compost orgànic no produït pel propi organisme) com alguns fàrmacs i substàncies cancerígenes.

La biosíntesi del grup hemo en els eritròcits és constant (com a mínim fins que el glòbul vermell perd el nucli). Aquest fet contrasta amb la producció hepàtica, on la biosíntesi està estretament regulada a través de l'ALA-sintasa, l'enzim que catalitza el primer pas de la síntesi del grup hemo. El mateix hemo i el Fe^{2+} controlen aquest enzim mitjançant retroinhibició, inhibició del transport de la ALA-sintasa des d'on es sintetitza fins al mitocondri i repressió de la síntesi de l'ALA. En els eritròcits, en canvi, el grup hemo activa la síntesi de proteïnes implicades en la seva pròpia síntesi en els reticulòcits (eritròcits immadurs). En aquest cas, els enzims regulats són la ferroquelatasa i la PBGD. El transport de Fe per part de la transferrina en el plasma també pot ser un factor limitant. L'existència de varis punts de control sembla indicar que en aquest cas, quan té lloc la síntesi de l'hemoglobina, tots els enzims treballen a la màxima velocitat possible.

I.2. LA FAMÍLIA DE LES PORFÍRIES

I.2.1. Tipus de porfíria

Existeixen diferents malalties genètiques relacionades amb la síntesi del grup hemo.⁴ Totes elles acumulen porfirina o els seus precursors i s'anomenen de forma general porfíries (figura i.5). En els eritròcits se'n coneixen dos: la porfíria eritropoiètica congènita (o PEC),⁵ que resulta de la deficiència en l'activitat de la U3S, i la protoporfíria eritropoiètica, deficiència en ferroquelatasa. S'acumula uroporfirinogen I i el seu producte de descarboxilació, el coproporfirinogen I, l'excreció del qual en orina la converteix en una substància de color vermell, la seva acumulació en les dents les hi dóna una coloració vermellosa fluorescent, la pell es torna extremadament sensible a la llum i s'ulcera produint doloroses butllofes, i augmenta en gran quantitat el pèl capil·lar. En general, les manifestacions de la PEC són heterogènies, des d'un fenotip aparentment normal, a una anèmia hemolítica severa en els fetus durant la gestació, passant per formes tardanes de manifestació de la malaltia, que a vegades es resumeix en lesions cutànies en l'adult, però sense més implicacions.

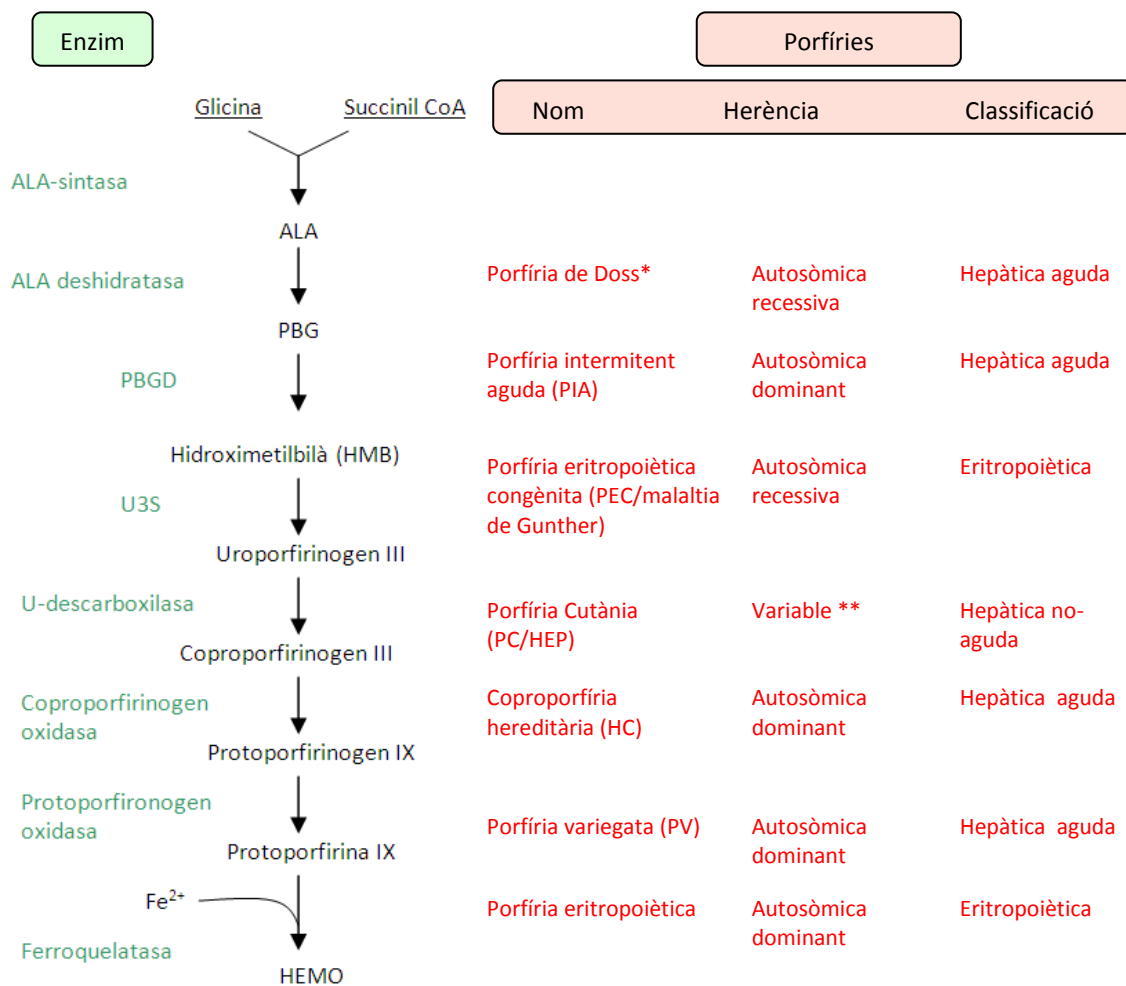


Figura I.5. Classificació general de les porfíries en humans. *La porfíria de Doss pren nom del seu descobridor.⁶ **En els casos documentats de PC s'ha vist que és una malaltia

d'herència autosòmica dominant, però la deficiència de l'activitat de l'enzim uroporfirinogen descarboxilasa també dona una patologia anomenada HEP (molt menys comú), hepatoporfíria, i en aquests casos l'herència és autosòmica recessiva.

La més comuna de les porfíries és la PIA,⁷ o porfíria intermitent aguda, causada per una deficiència en l'activitat de la PBGD. La PIA és una malaltia autosòmica dominant caracteritzada per atacs aguts de disfunció neuronal amb dolors abdominals, hipertensió, taucardí, i neuropatia perifèrica. Existeixen certs factors que poden degenerar en un atac de PIA en les persones afectades de PIA, com són el consum de drogues, dietes hipocalòriques, infeccions o factors endocrins. Aquesta malaltia sembla que podria explicar els episodis de psicosis i deteriorament mental que patia el pintor Vincent van Gogh, tal com descriuen L. S. Loftus i W. N. Arnold en un article publicat l'any 1991.⁸

I.2.2. Síntomes, diagnòstic i tractament

Els símptomes de les porfíria són molt diversos. La simptomatologia de les porfíries és molt variable, fins i tot dins d'un mateix tipus de porfíria, però totes inclouen acumulació de porfirines o dels seus precursors a nivell tissular. Tenint en compte la varietat de porfíries descrites anteriorment, es pot agrupar la simptomatologia en tres blocs principals: aparició de còlics (o dolors abdominals), fotosensibilitat, que pot donar lloc a erupcions, així com lesions dèrmiques de diversa severitat, i alteracions del sistema nerviós i muscular, com convulsions i alteracions mentals.

Degut a la gran diversitat fenotípica que poden presentar els pacients, les porfíries són en general malalties de difícil diagnòstic. Segons el tipus de porfíria l'afectació pot ser principalment a nivell neuronal o a nivell cutani. En el primer dels casos, en les porfíries agudes, com la porfíria intermitent aguda o les hepàtiques, el sistema nerviós es veu clarament afectat donant lloc a dolors abdominals, vòmits, neuropaties agudes i alteracions mentals (incloent al·lucinacions, depressions, crisis d'ansietat i paranoia). Solen desenvolupar-se arítmies cardíques i taucardies degut a l'alteració del sistema autonòmic nerviós. Pacients amb algun tipus de porfíria aguda s'ha vist que tenen més risc de desenvolupar un hepatocarcinoma, o càncer de fetge.

Per altra banda, en les porfíries eritropoiètiques o cutànies l'òrgan principalment afectat és la pell, causant foto sensibilitat (o foto dermatitis), ulceracions, necrosis dèrmica i cartilaginosa, picors i inflamacions, així com un creixement pilós anòmal en zones on normalment no n'hi ha o està poc desenvolupat. Generalment en aquest segon tipus de porfíries no es dona dolor abdominal.

En general, quan es sospita d'un possible cas de porfíria es realitzen anàlisis bioquímics tant de la sang, com de l'orina, com de les femtes. En el cas de les porfíries que cursen amb atacs aguts, l'anàlisi es sol realitzar durant els mateixos, ja que entre episodi i episodi s'ha vist que els nivells de porfirines i precursors poden ser normals. Un cop confirmat el diagnòstic de porfíria, estudis enzimàtics i genètics acabaran determinant el tipus de porfíria, identificant les diverses mutacions responsables. D'aquesta manera, és possible realitzar un seguiment de la transmissió de la mutació mitjançant estudis d'ADN de les famílies per diagnosticar els portadors asimptomàtics (aquells que no han desenvolupat la malaltia però que poden transmetre-la). Aquests estudis resulten essencials per a la prevenció de crisis agudes hepàtiques greus, i a nivell de consell genètic en el cas de les porfíries eritropoiètiques més severes. S'han descrit una sèrie de factors responsables d'atacs aguts de porfíria, com són el consum abusiu d'alcohol, el tabac i alguns fàrmacs, així com l'estrès emocional i físic.

El tractament de les porfíries en general és força divers, però sobretot dependrà de si es tracta d'un atac agut o no. En el primer cas, es tracta d'una urgència mèdica que requereix hospitalització. En aquest cas és important el tractament precoç en manifestar-se els primers símptomes.

En general, el tractament davant d'una crisi de porfíria es basa en l'administració intravenosa d'altres dosis de glucosa (ja que els carbohidrats reprimeixen l'activitat de l'ALA-sintasa; encara que els seus efectes són lents i no sempre és efectiu), administració d'hemo (per exemple en format d'argentat d'hemo, a una dosi de 2-3 mg/kg/dia dissolt en sèrum fisiològic i administrat per via central en uns 15-20 minuts durant uns 4 dies consecutius; és més eficaç que la glucosa, permetent la correcció del dèficit d'hemo a l'organisme i regula l'activitat de l'ALA-sintasa) i l'administració de β -bloquejants (com el propranolol) capaços de disminuir la hiperactivitat simpàtica. Per evitar el dèficit d'hemo, es sol recórrer a transfusions de sang en aparèixer els primers símptomes d'anèmia. Una altra mesura que es recomana específicament durant les crisis és evitar el desdèjuni i administrar una dieta rica en hidrats de carboni (amb un mínim de 400g de glucosa al dia).

La resta de tractaments són de suport, vigilants dels nivells de sodi (existeix el risc d'hiponatremia, o disminució de la concentració de sodi en sang per sota dels nivells considerats normals) i tenint precaució en la selecció de fàrmacs considerats segurs per a pacients amb porfíria, ja sigui davant d'atacs aguts^{9, 10} com en altres tipus de porfíria.¹¹ En alguns casos s'ha observat millora davant de tractaments amb cloroquinona (amb capacitat de fixar-se a les porfirines i facilitar-ne l'eliminació de l'organisme) i flebotomies (o extraccions de sang).^{12, 13} En alguns casos s'han realitzat transplantament de medul·la òssia,¹⁴ però l'èxit d'aquesta intervenció és relatiu.¹⁵

Actualment, s'apunta cap a una millora en el diagnòstic del tipus de porfíria, per poder seleccionar aquells casos en els quals es pugui determinar que la causa principal dels símptomes és una alteració d'un enzim en concret, i establir una teràpia gènica apropiada. Amb aquesta finalitat, els científics han d'establir quina és la conseqüència última de l'alteració del gen codificant de l'enzim.

I.3. LA PORFÍRIA ERITROPOIÈTICA CONGÈNITA (PEC)

I.3.1. Particularitats de la malaltia

La porfíria eritropoiètica congènita, PEC, va ser la primera porfíria humana a ser descrita i a relacionar-se amb un defecte en un enzim en concret (la uroporfirinogen III sintasa, U3S). Científics com J. C. Deybach^{16, 17} i W. Xu¹⁷ han descrit la relació directa que existeix entre la PEC i les mutacions del gen que codifica per la U3S. Aquestes mutacions poden ser delecions, insercions, inversions o canvis en una base nitrogenada d'un codó en concret (un codó pot codificar per a un determinat aminoàcid, i un sol canvi en una base pot implicar un canvi d'aminoàcid, o bé indicar al ribosoma que aturi la traducció i alliberi el polipèptid), que en última instància acaben generant un enzim alterat, l'activitat del qual es veu afectada.

Els portadors de la malaltia poden ser des d'asimptomàtics o amb fenotip lleu i no associat a la PEC, passant per anèmies moderades i ulceracions de la pell, fins a pacients dependents de transfusions de sang setmanals amb destrucció dèrmica i cartilaginosa severa. Aquest tipus de porfíria se sol manifestar precoçment, al poc temps del naixement, amb orina fosca, anèmia i formació d'ampolles cutànies (Imatge I.1), que en desprendre's deixen lloc a una lesió ulcerosa que quan cicatritzen donen lloc a la pèrdua de trets facials, així com d'orelles i dits. És per això que a aquesta malaltia també se la coneix com a Porfíria Mutilant.



Imatge I.1. Pacient amb úlceres facials de diverses mides, hiperpigmentació i depigmentació, fibrosis severa, i mutilacions severes presents a la cara, particularment al nas i a les orelles.¹⁸

Diversos assajos enzimàtics permeten caracteritzar de manera aproximada l'activitat relativa de l'enzim U3S alterat respecte a l'activitat de la U3S salvatge^{19, 20}. Aquesta disminució de l'activitat (no s'ha trobat cap pacient que presenti un increment de l'activitat enzimàtica de la U3S respecte de l'enzim salvatge) pot ser deguda a varis fenòmens: la mutació (o mutacions) de l'enzim defectuós pot afectar el centre catalític i per tant, en cas d'alterar un aminoàcid essencial en la catàlisi aquesta pot ser nul·la o molt baixa; en el cas de mutacions que alteren l'estructura de l'enzim, poden actuar desnaturalitzant-lo parcialment (per exemple provocant un

plegament proteic inactiu o parcialment inactiu), totalment, o bé alterant la capacitat de reconeixement del substrat per part de l'enzim.

L'activitat enzimàtica de la U3S és essencial per a la síntesi de porfirines biològicament actives, i per tant, és important la realització d'estudis estructurals i dels mecanismes d'acció de l'enzim per tal d'entendre'n el funcionament. Determinar el centre actiu, així com les superfícies de reconeixement del substrat poden ajudar en última instància als investigadors a establir teràpies específiques per cada causa determinada que dona lloc a aquesta malaltia.²¹ Actualment, hi ha diversos tractaments per als pacients de la PEC: alguns, però, no són idonis a llarg termini com és el cas del tractament amb *charcoal* (la ingesta del qual durant un període llarg de temps provoca una hipoabsorció de nutrients).²²

El diagnòstic de les Porfíria Eritropoiètica Congènita es basa en la detecció en sang i orina de nivells anormals de subproductes i metabòlits intermedis de la biosíntesi del grup hemo, i es complementa amb un anàlisi genotípic dels pacients i altres membres de l'arbre genealògic. Tractaments com el transplantament de medul·la espinal no han proporcionat resultats satisfactoris reproduïbles, la qual cosa ha fet que es comenci a plantejar la teràpia gènica.^{23, 24} Per poder optimitzar el desenvolupament d'aquest tipus de teràpia, i facilitar un diagnòstic apropiat als pacients, és imprescindible establir les bases moleculars d'aquesta patologia a partir de detallats estudis estructurals de la Uroporfirinogen III Sintasa salvatge i de les seves variants patogèniques.

I.3.2. Mutants patogènics responsables de la PEC

Degut als problemes que suposa el diagnòstic encara avui i el fet de que existeixen portadors asimptomàtics hi ha pocs casos de porfíria eritropoiètica congènita reconeguts al món, menys de 200, i per aquesta raó és considerada una malaltia rara. Existeixen diverses mutacions responsables de la PEC, incloent substitucions d'una base, insercions, delecions, i defectes d'empalmament (de l'anglès *splicing*, procés de rearranjament de les seqüències de ARNm que seran traduïdes a proteïna); totes elles donen lloc a un enzim alterat i comporten l'acumulació de la isoforma biològicament inactiva de l'uroporfirinogen I i els seus derivats.

Diversos assajos enzimàtics permeten caracteritzar de manera aproximada l'activitat relativa de l'enzim U3S alterat respecte a l'activitat de la U3S salvatge.^{19, 20} Aquesta disminució de l'activitat (no s'ha trobat cap pacient que presenti un increment de l'activitat enzimàtica de la U3S respecte de l'enzim salvatge) pot ser deguda a varis fenòmens: la mutació (o mutacions) de l'enzim defectuós pot afectar el centre catalític i per tant, en cas d'alterar un aminoàcid essencial en la catàlisi aquesta pot ser nul·la o molt baixa; en el cas de mutacions que alteren l'estructura de l'enzim, poden actuar desnaturalitzant-lo parcialment (per exemple provocant un

plegament proteic inactiu o parcialment inactiu), totalment, o bé alterant la capacitat de reconeixement del substrat per part de l'enzim.

Els mutants que s'han estudiat al llarg d'aquesta tesi són del tipus de mutació puntual, on només un residu de la proteïna U3S es veu alterat. D'aquest tipus de mutació puntual associada a un fenotip de PEC se n'han descrit 25, trobades en els diversos pacients afectats de porfíria eritropoiètica congènita, que es detallen a continuació:

Mutant	Mutació acompanyant en el genotip
V3F ²⁵	V3F
L4F ^{26, 27}	C73R, V82F
Y19C ²⁶	G225S
S47P ²⁸	S47P
P53L ¹⁶	P53L, C73R
T62A ^{26, 19}	Q248X
A66V ^{19, 26, 27}	C73R
A69T ^{14, 29}	A69T, C73R
C73R ^{16, 19, 26, 29, 30, 31, 32, 33, 34}	L4F, P53L, A66V, A69T, C73R, A104V, H173Y, G225S, T228M, G236V, P248Q
E81D ²⁹	G188W
V82F ²⁶	L4F
V99A ^{26, 32}	C73R, V99A
A104V ²⁶	C73R
I129T ³⁵	I129T
H173Y ³³	H173Y
Q187P ³³	C73R
G188R ³⁶	G188R
G188W ²⁹	E81D
S212P ³⁷	S212P
I219S ²⁹	I219S
G225S ^{19, 26, 38, 34}	Y19C, T228M
T228M ^{19, 33}	C73R, G225S
G236V ³⁰	C73R
L237P ³⁰	L237P
P248Q ^{33, 39}	C73R, P248Q

Taula I.1. Llista de mutacions puntuals de l'enzim U3S trobades en pacients diagnosticats de porfíria eritropoiètica congènita, i dels al·lells acompanyants en el genotip dels pacients.

I.4. L'ENZIM HUMÀ UROPORFIRINOGEN III SINTASA (U3S)

I.4.1. Antecedents estructurals i en solució

L'any 1958 Lawrence Bogorad demostrà per primera vegada la necessitat dels enzims porfobilinogen desaminasa i uroporfirinogen III sintasa en la síntesi d'uroporfirinogen III a partir de porfobilinogen (PBG).⁴⁰ Posteriorment es plantejà la hipòtesi de que ambdós enzims podrien estar formant un complex. Algunes de les evidències que recolzarien aquesta hipòtesi les presentaren l'any 1974 Feinsten i Fryman en observar que la U3S quedava retinguda en passar per una columna de Sepharosa amb PBGD unida,⁴¹ mentre que un any després Bogorad i Higuchi van publicar uns experiments on s'observava que en incrementar la concentració de PBGD en una solució amb U3S i PBG tenia lloc un augment de la velocitat de sedimentació en gradient de sucrosa de la U3S.⁴² Per altra banda, s'observaren algunes evidències cinètiques que donaren suport a la teoria, com l'al·lostèricisme de la formació de l'uroporfirinogen III (U3) a partir de PBG,⁴³ la disminució de la K_m del PBG en afegir U3S⁴⁴ i la disminució en la K_m de la U3S pel PBG quan el pirrol és generat incubant en presència de PBGD enlloc d'afegir-lo exogen.⁴⁵

L'estructura de la U3S humana va ser resolta per raigs X per Michael A. A. Mathews, Heidi L. Schubert i col·laboradors l'any 2001²⁰ amb una resolució de 1.85 Å, emprant una construcció recombinant de l'enzim amb 21 residus afegits a l'extrem amino terminal que contenia una cua d'histidines per afavorir-ne la purificació. Els intents dels autors de cristal·litzar simultàniament l'enzim U3S amb el seu substrat no van funcionar, mantenint-se així la incògnita sobre el centre actiu de l'enzim, tot i que ja es començava a apuntar cap a l'espai interdomini de la proteïna. L'analogia observada entre l'estructura de la U3S i la vitamina B12 feien pensar en la possibilitat de que l'activitat enzimàtica estigués centrada enmig dels dos dominis. Els autors van dissenyar un seguit de mutacions puntuals provocades en residus conservats (Figura I.6) per determinar el mecanisme catalític. D'aquests experiments se'n va poder concloure que cap de les mutacions puntuals semblaven tenir un paper essencial per a l'activitat catalítica de la U3S i d'aquí s'elaborà la hipòtesi de que el mecanisme catalític no incloïa reaccions àcid/base.

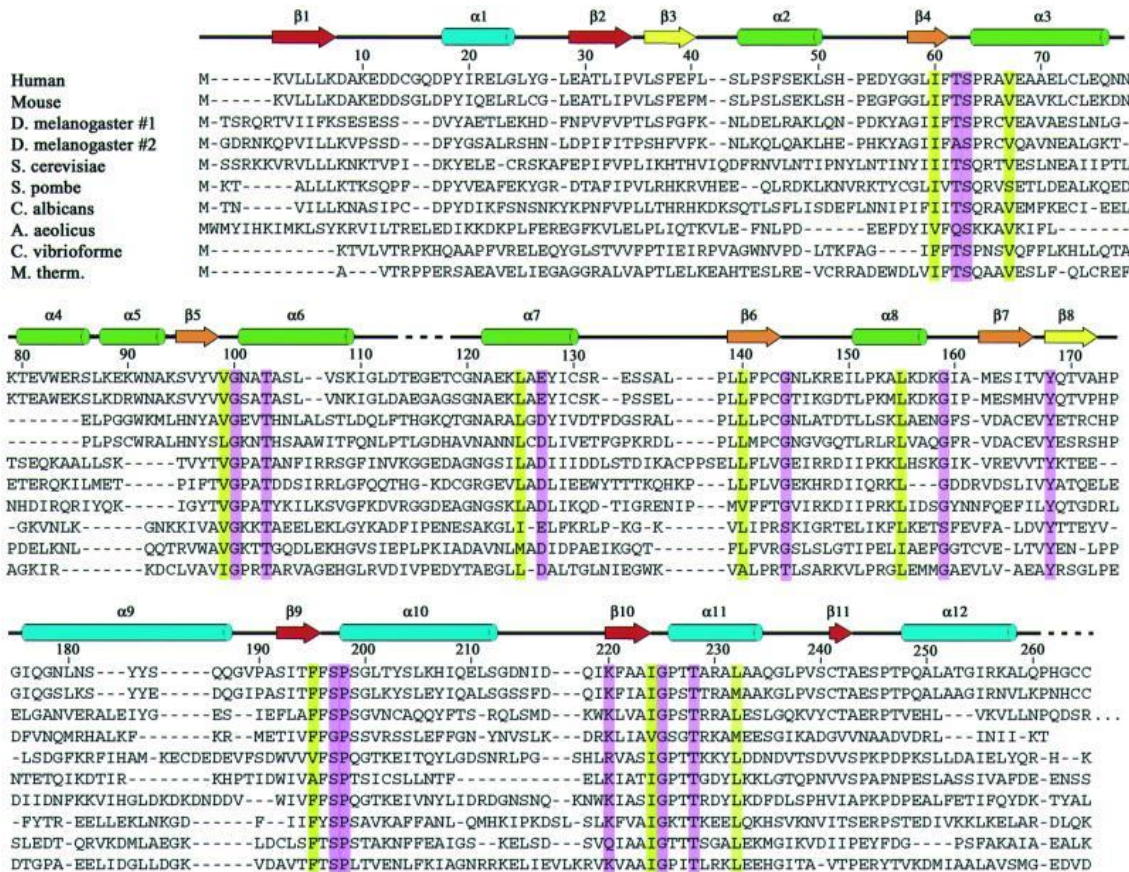


Figura I.6. Alineament de seqüències de la proteïna U3S²⁰ emprant el mètode Clustal,⁴⁶ emfatitzant els residus conservats amb la següent coloració: en magenta els residus exposats i en groc els soterrats. Els residus desordenats omesos del model estan indicats en línia discontinua. Les seqüències emprades en l’alineament provenen de les següents entrades de les bases de dades dels DDBJ/EMBL/GenBank: human, *Homo sapiens* (A40483); mouse, *Mus musculus* (A56838); *Drosophila melanogaster* (AAF46419 and AAF55222); *Saccharomyces cerevisiae* (NP_014921); *Schizosaccharomyces pombe* (P87214); *Candida albicans* (CAA22001); *Aquifex aeolicus* (E70452); *Chlorobium vibrioforme* (Q59335); *Methanobacterium thermoautotrophicum* (O26268).

Un dels estudis més recents en la cerca del centre actiu de la U3S és el que van portar a terme Cunha, Desnick i col·laboradors, que es publicà l’any 2008.²¹ En l’estudi realitzat amb tècniques de ressonància magnètica nuclear, es van realitzar titracions de l’enzim U3S amb l’inhibidor nD-metil-1-formilbilà o NMF-bilà, i amb el seu producte de reacció, l’uroporfirinogen III (ambdós productes s’havien observat com a inhibidors competitiu de la unió amb el substrat^{47, 48}), i s’observà el canvi en els desplaçaments químics dels residus de l’enzim. Els resultats d’ambdós experiments mostraren l’efecte dels dos compostos en l’enzim U3S (Figura I.7), apuntant la seva possible implicació en la catàlisi. En concret, els residus considerats claus des d’un punt de vista catalíticament important semblen ser: L6, K7, D8, I33, V35, L36, T62, S63, R65, G100, T103, R148, L151, F196, S197, G200, A229, i L251. D’aquests, L6, K7, I33, L36, T62, S63, R65, G100, T103, F196, S197, G200, i L251 es troben altament conservats (entre un 92 i un 100% d’identitat en 13 organismes eucariotes). Tal i com s’havia anat suggerint, la

distribució dels residus relacionats amb la catàlisi apunten que la localització del centre catalític es troba entre els dos dominis de la sintasa.

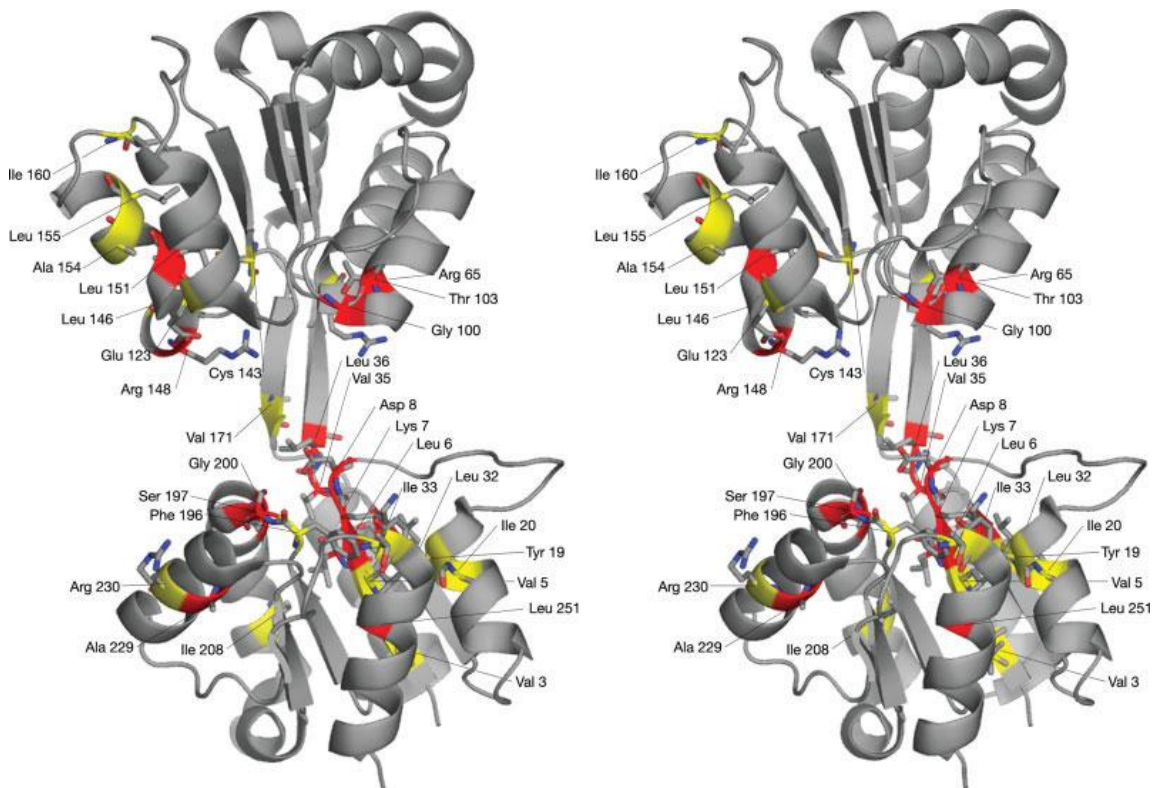


Figura I.7. Estereograma de l'estructura cristal·lina de la U3S visualitzada amb el programa Pymol⁴⁹ on es mostren en groc i vermell aquells residus que es veuen moderadament afectats (groc) i altament afectats (vermell) en realitzar una valoració amb U3 (esquerra) i l'inhibidor NMF-bilà (dreta), publicat per Desnick i col·laboradors l'any 2008.²¹

La proteïna U3S adopta una conformació bilobulada en la qual els dos dominis es troben connectats per dues làmines de full beta antiparal·lel. Els dos dominis tenen un plegament similar, formats ambdós per làmines beta i hèlixs alfa. El domini 1 (residus 1-35 i 173-260) forma part dels dominis similars a la flavodoxina i està format per cinc cadenes paral·leles de full beta envoltades per cinc hèlixs alfa. El domini 2 adopta una estructura similar a les glicosilades d'ADN, on quatre cadenes paral·leles de full beta es troben envoltades per set hèlixs alfa. Tot i la topologia similar que presenten els dos dominis les hèlixs alfa difereixen en la seva disposició. L'extrem carboxil de la cadena polipeptídica acaba en una làmina beta en el domini 1.

La distribució de residus altament conservats suggereix que el centre catalític de l'enzim es troba localitzat en l'espai que formen els dos dominis. Les variacions en les posicions relatives observades dels dos dominis entre molècules cristal·logràficament independents indica la presència de flexibilitat. S'ha proposat que l'obertura i tancament d'aquest solc de la U3S podria ser important per a la catàlisi.²⁰ Així, la conformació oberta facilitaria l'accés i unió al

substrat, mentre que es requeriria la conformació tancada de l'enzim per al tancament de l'anell tetrapirròlic.

I.4.2. Mecanisme catalític de l'enzim

L'uroporfirinogen III sintasa catalitza la ciclació del tetrapirrol lineal, el porfobilinogen (o PBG), amb inversió del quart anell (anell D),⁵⁰ donant lloc a l'asimètric uroporfirinogen III (Figura I.8). De tots els mecanismes proposats, el més econòmic en termes de nombre de passos és el que utilitza el grup hidroximetil del C20 del substrat PBG com a electròfil. El grup hidroxil del C20 es perd generant-se així un carbocatió que atacarà electrofílicament el C16, donant lloc a un intermediari pirrolenine espirocíclic de pirrolenina, que pot evolucionar cap a l'azafulvè. Aquest darrer compost pot ciclar donant el producte de la catàlisi, l'uroporfirinogen III. L'essència d'aquesta síntesi va ser proposada inicialment per Mathewson i Corwin l'any 1961,⁵¹ i modificada posteriorment per Leeper,⁵² Pichon,⁵³ i col·laboradors l'any 1994. En concret Leeper hipotetitza que les cadenes laterals carregades negativament de l'anell D del PBG interaccionarien amb els grups carregats positivament de la U3S, i aquesta interacció provocaria una força de torsió en l'anell pirròlic que acabaria donant lloc a l'URO-III. Aquest esquema és consistent amb els experiments de carboni marcat portats a terme per Battersby i col·laboradors publicats l'any 1978, amb els quals demostraren que l'anell D patia una inversió. Per altra banda, la utilització d'un anàleg de l'intermediari espirocíclic proposat (un espirolactàmic sintètic estable que difereix només en tenir una amida enlloc d'una imida) recolza el model de síntesi ja que actua d'inhibidor de la U3S amb una K_i d'entre 1-2 μM .^{54, 55}

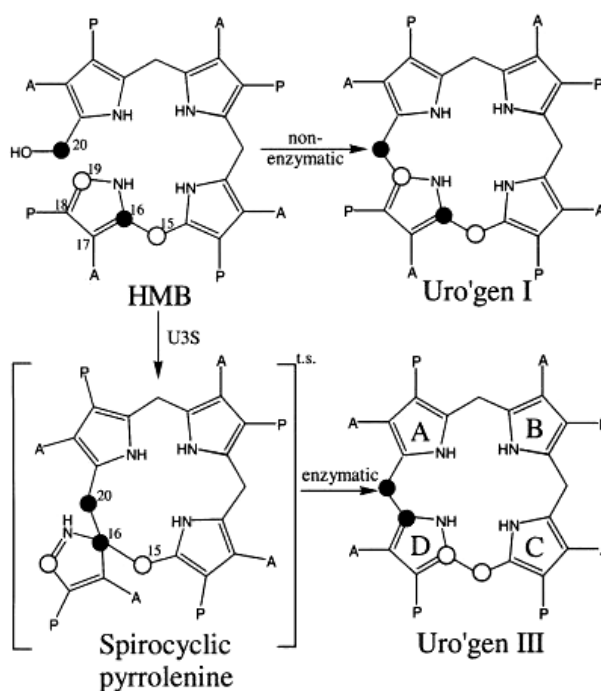


Figura I.8. Conversió del PBG a U1 (ciclació no enzimàtica) i a U3. A = acetat, P = propionat. El tetrapirrol lineal és ciclat per la U3S, formant-se l'intermediari de l'estat de transició, el pirrolenine espirocíclic.²⁰

I.4.2.1. Breu introducció a la RMN

Els nuclis de determinats isòtops d'alguns elements tenen una propietat denominada espín, que fa que els nuclis es comportin com petits imans en presència d'un camp magnètic. Només un número limitat d'isòtops posseeix aquesta propietat; alguns que són útils en els experiments de la present tesi es detallen en la següent taula:

<i>Isòtop</i>	<i>Espín</i>	<i>Abundància natural (%)</i>	<i>Sensibilitat relativa</i>	<i>Freqüència de RMN (MHz)</i>
¹ H	½	99.98	1.0	800.0
² H	1	0.015	1.5 x 10 ⁻⁶	122.8
¹³ C	½	1.108	1.8 x 10 ⁻⁴	201.2
¹⁵ N	½	0.365	3.8 x 10 ⁻⁶	81.1

Taula I.2. Nuclis sensibles al fenomen de ressonància més importants per a l'estudi de proteïnes. Les freqüències són les que corresponen per a un espectrofotòmetre de 800 MHz (un iman de 18,81 T) i les sensibilitats relatives ho són respecte del protó, i inclouen de sensibilitat intrínseca del propi nucli i les abundàncies naturals.⁵⁶

En presència d'un camp magnètic, es produeix un desdoblament dels nivells energètics (efecte Zeeman). La diferència de nivells energètics correspon a la freqüència de les ones de ràdio i de les microones amplificant la resposta mitjançant ressonància magnètica nuclear, o RMN. La RMN fou descrita per primera vegada per Felix Bloch i Edward Mills Purcell l'any 1946, guanyant el Premi Nobel de Física el 1952 per aquest descobriment.

L'interès del fenomen rau en què la ressonància magnètica nuclear es molt sensible a la constitució química de la molècula i, en particular, a l'entorn que envolta el nucli en qüestió. Per exemple, els hidrògens d'un compost determinat poden ressonar a diferents freqüències. Aquestes diferències solen expressar-se en termes de desplaçaments químics (δ) definits respecte al material de referència afegit a la mostra:

$$\delta = \frac{H_{ref} - H}{H_{ref}} \times 10^6 \quad \text{[Equació I.1]}$$

on H és la intensitat del camp per la ressonància del nucli en qüestió, i H_{ref} és la del nucli de referència.

El primer espectre d'una proteïna (una ribonucleasa) es va realitzar al 1957.⁵⁷ En l'espectre, que va ser adquirit a 40 MHz, s'observava una banda ampla no resolta que contenia més de 800 senyals. En un principi no es veia clar la informació que es podia obtenir emprant la RMN sobre les molècules biològiques. En un primer moment es feien estudis de desnaturalització, que permeteren l'assignació de senyals individuals i establir les diferències per discernir entre

els dos estats.⁵⁸ Aviat es va veure les grans possibilitats en el món de la dinàmica de proteïnes, entre d'altres biomolècules. Es van començar a estudiar les interaccions de macromolècules biològiques amb petits lligands, ja que la interacció provocava canvis en els desplaçaments i/o en l'amplada dels senyals.⁵⁹ Seguidament es va proposar el marcatge isotòpic com a tècnica d'assignació, de manera que s'obtenia una major resolució dels espectres.

Des que al 1967 McDonald i Phillips obtenien el primer espectre d'una proteïna amb un espectròmetre d'alt camp,⁶⁰ passant per Gibbons⁶¹ i l'assignació completa d'un esquelet proteic l'any 1975, la resolució de l'estructura de l' α -amilasa en solució per Wüthrich i el seu equip l'any 1988,⁶² fins a les tècniques actuals d'estudi estructural i caracterització dinàmica de proteïnes, l'evolució de la RMN com a eina espectroscòpica ha viscut una evolució espectacular. En els últims anys, els avenços tècnics i teòrics han permès el desenvolupament d'una metodologia de RMN aplicada a proteïnes extraordinàriament efectiva.

Un dels límits de l'aplicabilitat de la RMN radica en la sensibilitat dels instruments de mesura. Dos factors principals han incrementat de forma important la sensibilitat dels espectròmetres. Per una banda, l'augment del camp magnètic, fins a 800 i 900 MHz. Per altra banda, l'ús de les actuals sondes criogèniques que permeten, per un camp donat, augmentar la relació senyal/soroll del espectròmetre en un ordre de magnitud.

L'amplada intrínseca de les senyals d'estudi, que incrementa de manera important amb el pes molecular de la proteïna, dificulta no només l'observació de les pròpies senyals, sinó també dels seus acoblaments. Per evitar aquest efecte ja s'havia recorregut prèviament al marcatge amb deuteri de les proteïnes.⁶³ Fa deu anys Pervushin idea el mètode denominat TROSY (Transverse Relaxation-Optimized Spectroscopy).⁶⁴ En una proteïna marcada i en un experiment sense desacoblar, la senyal d'un protó acoblat a un nucli de ^{15}N dona lloc a quatre senyals (degut al desenvolupament de l'acoblament JHN durant l'evolució i l'adquisició). L'experiment TROSY selecciona únicament la transició que relaxa més lentament (la més estreta), augmentant la resolució de l'experiment.

I.4.3. Possibles efectes de les mutacions: pèrdua en l'activitat catalítica i/o pèrdua d'estabilitat

Una mutació puntual en un enzim pot desestructurar-lo parcial o totalment, fet que sovint acaba afectant a la seva funcionalitat. Per altra banda, una mutació puntual pot no alterar l'estructura de l'enzim però afectar a un residu catalíticament important. En ambdós casos, el resultat és una alteració en la capacitat enzimàtica de la proteïna.

En el cas de les 25 mutacions puntuals relacionades amb la porfíria eritropoiètica congènita, s'han realitzat estudis que demostren que els enzims mutants tenen una activitat menor que la proteïna U3S salvatge, però sense discernir entre mutacions que afecten a un residu catalític o mutacions que fan perdre l'estructura a la proteïna. Mentre que en el primer cas l'enzim no pot recuperar la seva activitat *per se*, en el segon cas la proteïna pot ser estudiada des d'un punt de vista d'estabilitat, buscant molècules que puguin evitar la pèrdua de l'estructura.

I.4.4. Estabilitat cinètica de les proteïnes en el context de les malalties estructurals

Al llarg de la història de la medicina s'ha descobert que moltes de les patologies trobades en humans són degudes a alteracions en proteïnes. Un nombre significatiu d'aquestes proteïnes tenen una funció enzimàtica per a les cèl·lules, i aquesta activitat pot veure's alterada per modificacions en la seqüència dels aminoàcids que conformen la proteïna i/o en l'activitat enzimàtica de la mateixa. Sovint, la causa d'una activitat enzimàtica deficient ve donada per una modificació en l'estructura de l'enzim, ja sigui per un desplegament total i irreversible o bé degut a un plegament proteic anòmal, que en definitiva, acaba donant lloc a una alteració d'un procés enzimàtic concret.

Experiments de desnaturalització de proteïnes realitzats *in vitro* suggereixen que, degut a fenòmens irreversibles, l'estabilitat termodinàmica (per exemple, valors positius en l'energia de desplegament de Gibbs) no garanteix que una proteïna es mantindrà en l'estat natiu durant un període de temps indefinit. A més, aquests processos irreversibles succeeixen més sovint *in vivo* que *in vitro*, ja que a) algunes alteracions irreversibles (com l'agregació, interaccions no desitjades amb altres components macromoleculars, o fenòmens de proteòlisi) es suposa que tenen lloc més ràpidament en un ambient cel·lular i b) en molts casos l'escala cronològica *in vivo* (probablement relacionat amb el temps de degradació mig de la proteïna) es suposa que és major que el temps que s'empra en els experiments *in vitro* (de l'ordre de minuts). Així doncs, en molts casos s'ha determinat que perquè una població d'una proteïna evolucioni cap a l'estat irreversible, és necessari primer superar una barrera energètica d'activació que separa l'estat natiu de la resta d'estats (desplegats, parcialment desplegats, incorrectament plegats).

En el cas de patologies degudes a alteracions en la seqüència d'aminoàcids d'una proteïna en concret, resulta molt interessant entendre per quin mecanisme la proteïna es veu afectada. D'aquesta manera, si la mutació provoca una disminució en l'energia d'activació necessària per superar la barrera cap a un estat de transició, tot i no estar alterant l'activitat de la proteïna directament, sí està provocant una acceleració i desplaçament de la població de la proteïna cap a un estat desplegat i, en molts casos, cap a una situació de desplegament irreversible. En aquests casos on la proteïna no és capaç d'evolucionar de nou cap a l'estat natiu degut a

l'elevada velocitat de pas cap a l'estat irreversible, es diu que el sistema està regit per un equilibri cinètic.

En el cas de malalties relacionades amb aquest tipus d'estabilitat cinètica, l'interès sovint es centra en determinar si és la pròpia manca d'activitat de la proteïna deguda a la desestabilització o l'acumulació dels agregats de la mateixa (com seria el cas de l'Alzheimer, o el de la polineuropatia amiloide familiar) el que acaba provocant la patologia, amb la finalitat de poder establir una teràpia idònia en cada cas.

I.5. ACTIVITAT U3S EN EL CONTEXT DE LA CÈL·LULA

I.5.1. Mecanisme catalític *in vivo*.

Inicialment es pensava que els dos enzims PBGD i U3S, que generen l'U3 a partir del PBG, podrien estar interactuant o formant un complex citoplasmàtic.⁴¹⁻⁴⁴ En primer lloc, el producte de la reacció catalitzada per la PBGD (que ahora és el substrat de la U3S) és una molècula inestable: es transforma en U1 mitjançant una reacció no enzimàtica (

Figura I.8). Quan aquest metabòlit es genera, la síntesi del grup hemo es veu bloquejada i la porfirina s'acumula en teixits. La vida mitja del preuroporfirinogen és realment molt baixa, per la qual cosa no pot ser emmagatzemat, sinó que s'ha de sintetitzar en el moment en què la cèl·lula el requereix per continuar la síntesi del grup hemo. En segon lloc, els gens que codifiquen per a la U3S i la PBGD (*hemC* i *hemD* respectivament) es troben continguts en l'operó *hem*, la qual cosa implica que presenten una regulació gènica similar.

Estudis recents *in vitro* demostren que en determinades condicions experimentals aquesta associació enzimàtica sembla no tenir lloc, i que tant la U3S com la PBGD funcionarien de forma independent i seqüencial amb el hidroximetilbilà (o preuroporfirinogen) com a intermediari lliure de les dues reaccions.^{45, 65} Sigui com sigui, l'activitat catalítica d'aquests dos enzims ha d'estar estrictament regulada *in vivo*, ja que en condicions normals l'acumulació de PGD i d'U1 és molt baixa. Aquesta regulació continua sent una incògnita en el moment d'elaboració de la present tesi.

Com ja s'ha comentat en la l'apartat I.4.2., el mecanisme catalític sembla tenir lloc en el solc que es genera entre els dos dominis, i mentre que el potencial electrostàtic de la superfície de la U3S és majoritàriament negatiu, la regió del solc està majoritàriament carregada positivament, la qual cosa apunta cap en la direcció de la interacció amb els lligands experimentalment determinada amb els estudis de pertorbació per RMN.⁶⁶

I.5.2. Localització de l'enzim i transport. Tècniques de monitoratge *in vivo*

En humans, la síntesi del grup hemo es troba estretament lligada al mitocondri: algunes de les reaccions tenen lloc a dins de l'òrganul mentre que d'altres, com la que porta a terme la uroporfirinogen III sintasa, s'ha descrit que tenen lloc al citoplasma cel·lular. De totes maneres, existeixen un seguit d'incògnites que continuen sense ser resoltes en el moment de la redacció de la present tesi. Per exemple, factors com la localització de la síntesi de la U3S, així com el transport de l'enzim fins a la seva destinació final, o la necessitat d'intervenció de xaperones per al correcte plegament de la proteïna, continuen desconeguts.

Avui en dia existeixen un seguit de tècniques que permeten caracteritzar un enzim en el seu entorn biològic natural. Un dels grans passos en aquest sentit és la utilització de cèl·lules transfectades amb el gen que codifica per l'enzim en qüestió, dins el món cada cop més explotat de les clonacions. Emprant tècniques com la immunotransferència de proteïnes (en anglès *western-blotting*), és possible determinar, entre d'altres, l'expressió de l'enzim d'interès en diferents tipus cel·lulars, així com estudiar efectes de diversos tractaments sobre un mateix teixit cel·lular. Sovint, els estudis d'expressió de proteïna es solen recolzar amb experiments d'immunotransferència de proteïnes i amb experiments de control d'expressió gènica, per tenir un control de si realment el gen codificant per a la proteïna d'interès s'està expressant en el sistema biològic i en les condicions en les quals s'està treballant. En aquest sentit, una de les tècniques actualment més emprada és la reacció en cadena de la polimerasa, RT-PCR a temps real quantitativa, o qRT-PCR, que permet veure quina és la quantitat total d'ARN missatger (o ARNm, molècula codificant d'una cadena polipeptídica) present a les mostres.

Per altra banda, per poder estudiar la localització *in vivo* d'un enzim d'interès es pot tractar la mostra cel·lular amb anticossos que reconeguin a l'enzim i a la vegada puguin ser reconeguts per uns segons anticossos capaços d'emetre una fluorescència que es pugui detectar mitjançant microscopis òptics, o confocals. Aquesta tècnica s'anomena immunofluorescència. També és possible treballar amb enzims que contenen una cua o *tag* que emet fluorescència, com en el cas de les construccions amb GFP (la *Green Fluorescence Protein*,^{67, 68} amb dos pics d'excitació: un menor a 475 nm i un de major a 395 nm; l'emissió de la GFP és a 509 nm, en la zona verda de l'espectre, d'aquí el seu nom) que tot i la seva versatilitat, el fet d'unir una proteïna fluorescent (en el cas de la GFP de 238 residus) a l'enzim d'interès ja pot estar alterant-ne no només la localització cel·lular, sinó fins i tot l'activitat i/o el correcte plegament.

Un dels punts crítics de la immunofluorescència és el tractament de les mostres, ja que és necessari fixar les cèl·lules sense alterar-ne la composició ni l'estructura, amb la finalitat última d'obtenir resultats el més semblants a les condicions biològiques. Existeixen varies opcions per a la fixació que no dificulten la distribució de l'anticòs, ni malmeten l'antigen ni alteren la morfologia d'altres constituents cel·lulars. Per exemple, alguns epítops (o determinants antigènics) es perden en la fixació amb metanol, però es preserven en una fixació amb formaldehid. Degut a que s'ha vist que alguns anticossos donen problemes amb un o altre element de fixació, resulta interessant treballar amb el màxim de variables possibles.

BIBLIOGRAFIA CAPÍTOL I

- ¹ Doss M.; von Tiepermann R.; Schneider J. *Porphobilinogen-synthase (delta-aminolevulinic acid dehydratase) deficiency in bone marrow cells of two patients with porphobilinogen-synthase defect acute porphyria*. *Klin. Wschr.* 61, 14:699-702 (1983).
- ² Dyer J.; Garrick D. P.; Inglis A.; Pye I. F. *Plumboporphyria (ALAD deficiency) in a lead worker: a scenario for potential diagnostic confusion*. *Brit. J. Indust. Med.* 50, 12:1119-1121 (1993).
- ³ http://minnie.uab.es/~veteri/21207/Tema14_porfirinas.pdf (14/04/10).
- ⁴ Gouya L.; Puy H.; Robreau A. M.; Lyoumi S.; Lamoril J.; Da Silva V.; Grandchamp B.; Deybach J.C.; *Modulation of penetrance by the wild-type allele in dominantly inherited erythropoietic protoporphyria and acute hepatic porphyrias*. *Hum. Genet.* 114, 3:256-262 (2004).
- ⁵ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=263700> (14/04/10).
- ⁶ Doss M.; von Tiepermann, R.; Schneider J.; Schmid H. *New type of hepatic porphyria with porphobilinogen synthase defect and intermittent acute clinical manifestation*. *Klin. Wschr.* 57, 20:1123-1127 (1979).
- ⁷ Meyer, U. A., Strand, L. J., Doss, M., Rees, A. C. and Marver, H. S. *Intermittent acute porphyria—demonstration of a genetic defect in porphobilinogen metabolism*. *N. Engl. J. Med.*, 286, 1277-1282 (1972).
- ⁸ Loftus S.; Arnold W. N. *Vincent van Gogh's illness: acute intermittent porphyria?* *BMJ.* 303, 6817:1589–1591 (1991).
- ⁹ <http://www.wmic.wales.nhs.uk/pdfs/bulletins/Porphyrina%20bulletin%20July%202008.pdf> (pàg. 10-12; 26/05/2009).
- ¹⁰ <http://www.cs.nsw.gov.au/cs/PAH/porphyria/druglist1.htm> (26/05/2009).
- ¹¹ <http://www.porphyrina.uct.ac.za/druginfo/drug-frameset-alpha.htm> (26/05/2009).
- ¹² Guzmán M. H., Stella A. M., Batlle A. M. del C., Pietropalo N., Cabrera H. N. *Therapeutic evaluation of porphyria cutanea tarda with phlebotomy and chloroquine: study of 12 cases*. *Arch. Argent. Dermatol.* 36(2):73-83 (1986).
- ¹³ Guzmán M. H., Malitto V., Stella A. M., Parera V., Batlle A. *Therapy in porphyria cutanea tarda with phlebotomies and chloroquine: evaluation a 5-12 years therapy*. *Rev. Argent. Dermatol.* 77(1):46-49 (1996).
- ¹⁴ Dupuis-Girod S., Akkari V., Ged C., Galambrun C., Kebaïli K., Deybach J-C., Claudy A., Geburher L., Philippe N., Verneuil H., Bertrand Y. *Successful match-unrelated donor bone marrow transplantation for congenital erythropoietic porphyria (Günther disease)*. *Eur. J. Pediatr.* 164:104–107 (2005).

- ¹⁵ Medina C. E., Carbajal B., Ponce C., Sandoval N., Valladares E. *Las Porfirias*. Rev. Med. Hond. 68:16-24 (2000).
- ¹⁶ Deybach J. C.; de Verneuil H.; Boulechar S.; Grandchamp B.; Nordmann Y. *Point mutations in the uroporphyrinogen III synthase gene in congenital erythropoietic porphyria (Gunther's disease)*. Blood, 75, 9:1763-1765 (1990).
- ¹⁷ Xu W.; Astrin K. H.; Desnick R. J. *Molecular basis of congenital erythropoietic porphyria: mutations in the human uroporphyrinogen III synthase gene*. Hum. Mutat. 7, 3:187-192 (1996).
- ¹⁸ Fritsch C., Bolsen K., Ruzicka T., Goerz G. *Congenital erythropoietic porphyria*. J. A. A. Dermatol. 36, 4:594-610 (1997).
- ¹⁹ Warner A. C.; Yoo H. W.; Roberts A. G.; Desnick R. J. *Congenital Erythropoietic Porphyria: Identification and Expression of Exonic Mutations in the Uroporphyrinogen III Synthase Gene*. J. Clin. Invest. 89, 2:693-700 (1992).
- ²⁰ Mathews M. A. A.; Schubert H. L.; Whitby F. G.; Alexander K. J.; Schadick K.; Bergonia H. A.; Philips J. D.; Hill C. P. *Crystal structure of human uroporphyrinogen III synthase*. The EMBO Journal, 20, 21:5832-5839 (2001).
- ²¹ Cunha L., Kuti M., Bishop D. F., Mezei M., Zeng L., Zhou M-M., Desnick R. J. *Human uroporphyrinogen III synthase: NMR-based mapping of the active site*. Proteins 71:855-873 (2008).
- ²² Pimstone N. R.; Gandhi S. N.; Mukerji S. K. *Therapeutic efficacy of oral charcoal in congenital erythropoietic porphyria*. N Engl J Med. 316, 7:390-393 (1987).
- ²³ Lindberg R. L.; Porcher C.; Grandchamp B.; Ledermann B.; Burki K.; Brandner S.; Aguzzi A.; Meyer U. A. *Porphobilinogen deaminase deficiency in mice causes a neuropathy resembling that of human hepatic porphyria*. Nat. Gen. 12, 2:195-199 (1996).
- ²⁴ Johansson A.; Nowak G.; Moller C.; Harper P. *Non-viral delivery of the porphobilinogen deaminase cDNA into a mouse model of acute intermittent porphyria*. Mol. Genet. Metab. 82, 2:20-26 (2004).
- ²⁵ Takamura N., Hombrados I., Tanigawa K., Namba H., Nagayama Y., de Verneuil H., Yamashita S. *Novel point mutation in the uroporphyrinogen III synthase gene cause congenital erythropoietic porphyria of a Japanese family*. Am. J. Med. Genet. 70:299-302(1997).
- ²⁶ Xu W., Warner C. A., Desnick R. J. *Congenital Erythropoietic Porphyria: Identification and Expression of 10 Mutations in the Uroporphyrinogen III Synthase Gene*. J. Clin. Invest. 95(2):905-912 (1995).
- ²⁷ Warner C. A., Poh-Fitzpatrick M. B., Zaider E. F., Tsai S. F., and Desnick R. *Congenital erythro-poietic porphyria: a mild variant with low uroporphyrin I levels due to a missense mutation (A66V) encoding residual uroporphyrinogen III synthase activity*. J. Arch. Dermatol. 128:1243-1248 (1992).

-
- ²⁸ Ged C., Megarbane H., Chouery E., Lalanne M., Megarbane A., and de Verneuil H. *Congenital Erythropoietic Porphyria: Report of a Novel Mutation with Absence of Clinical Manifestations in a Homozygous Mutant Sibling*. *J. Invest. Dermatol.* 123:589-591 (2004).
- ²⁹ Shady A. A., Colby B. R., Cunha L. F., Astrin K. H., Bishop D. F., and Desnick R. J. *Congenital erythropoietic porphyria: identification and expression of eight novel mutations in the uroporphyrinogen III synthase gene*. *British journal of haematology* 117:980-987 (2002).
- ³⁰ Wiederholt T., Poblete-Gutiérrez P., Gardlo K., Goerz G., Bolsen K., Merk H.F., Frank J. *Identification of Mutations in the Uroporphyrinogen III Cosynthase Gene in German Patients with Congenital Erythropoietic Porphyria*. *Physiol. Res.* 55 (Suppl. 2): S85-S92 (2006).
- ³¹ Lazebnik N., and Lazebnik R. S. *The prenatal presentation of congenital erythropoietic porphyria: report of two siblings with elevated maternal serum alpha-fetoprotein*. *Prenatal Diagnosis* 24:282-286 (2004).
- ³² Bishop, D. F., Johansson, A., Phelps, R., Shady, A. A., Ramirez, M. C., Yasuda, M., Caro, A., and Desnick, R. *Uroporphyrinogen III Synthase Knock-In Mice Have the Human Congenital Erythropoietic Porphyria Phenotype, Including the Characteristic Light-Induced Cutaneous Lesions*. *J. Am. J. Hum. Genet.* 78:645-658 (2006).
- ³³ Fontanellas A., Bensidhoum M., Enriquez de Salamanca R., Moruno Tirado A., de Verneuil H., and Ged C. *Eur. J. Hum. Genet.* 4:274-282 (1996).
- ³⁴ Solis, C., Aizencang, G. I., Astrin, K. H., Bishop, D. F., and Desnick, R. J. *Uroporphyrinogen III synthase erythroid promoter mutations in adjacent GATA1 and CP2 elements cause congenital erythropoietic porphyria*. *The Journal of clinical investigation* 107:753-762 (2001).
- ³⁵ Rogounovitch, T., Takamura, N., Hombrados, I., Morel, C., Tanaka, T., Kameyoshi, Y., Shimizu-Yoshida, Y., de Verneuil, H., and Yamashita, S. *Congenital Erythropoietic Porphyria: a Novel Homozygous Mutation in a Japanese Patient*. *J Invest Dermatol* 115:1156 (2000).
- ³⁶ Tezcan, I., Xu, W., Gurgey, A., Tuncer, M., Cetin, M., Oner, C., Yetgin, S., Ersoy, F., Aizencang, G., Astrin, K. H., and Desnick, R. J. *Congenital Erythropoietic Porphyria Successfully Treated by Allogeneic Bone Marrow Transplantation*. *Blood* 92:4053-4058 (1998).
- ³⁷ Tanigawa, K., Takamura, N., and Yamashita, S. *Congenital erythropoietic porphyria*. *Nippon Rinsho* 53:1422-1426 (1995).
- ³⁸ Berry A. A., Desnick R. J., Astrin K. H., Shabbeer J., Lucky A. W., and Lim H. W. *Two Brothers With Mild Congenital Erythropoietic Porphyria Due to a Novel Genotype*. *Arch. Dermatol.* 141:1575-1579 (2005).
- ³⁹ To-Figueras, J., Badenas, C., Mascaro, J. M., Madrigal, I., Merino, A., Bastida, P., Lecha, M., and Herrero, C. *Blood Cells Mol. Dis. Study of the genotype-phenotype relationship in four cases of congenital erythropoietic porphyria*. 38:242-246 (2007).

- ⁴⁰ Bogorad L. *The enzymatic synthesis of porphyrins from porphobilinogen. II. Uroporphyrin III.* J. Biol. Chem. 233:510-515 (1958).
- ⁴¹ Frydman R. B., Feinstein G. *Studies on porphobilinogen deaminase and uroporphyrinogen 3 cosynthase from human erythrocytes.* Biochim. Biophys. Acta 350:358-373 (1974).
- ⁴² Higuchi M., Bogorad L. *The purification and properties of uroporphyrinogen I synthases and uroporphyrinogen III cosynthase. Interactions between the enzymes.* Ann. N. Y. Acad. Sci. 244:401-418 (1975).
- ⁴³ Sancovich H. A., Battle A. M. i Grinstein M. *Porphyrin biosynthesis. VI. Separation and purification of porphobilinogen deaminase and uroporphyrinogen isomerase from cow liver porphobilinogenase an allosteric enzyme.* Biochim. Biophys. Acta. 191:130-143 (1969).
- ⁴⁴ Battersby A. R., Fookes C. J. R., Matcham G. W., McDonald E., Gustafson-Potter K. E. *Biosynthesis of the natural porphyrins: experiments on the ring-closure steps and with the hydroxy-analogue of porphobilinogen.* J. Chem. Soc. Chem. Commun. 316-319 (1979).
- ⁴⁵ Tsai S. F., Bishop D. F., Desnick R. J. *Coupled-enzyme and direct assays for uroporphyrinogen III synthase activity in human erythrocytes and cultured lymphoblasts. Enzymatic diagnosis of heterozygotes and homozygotes with congenital erythropoietic porphyria.* Anal. Biochem. 166:120-133 (1987).
- ⁴⁶ Higgins D.G. and Sharp, P.M. *Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer.* Comput. Appl. Biosci., 5:151-153 (1989).
- ⁴⁷ Pichon C., Atshaves B. P., Xue T., Stolowich N. J., Scott A. I. *Studies on URO'gen III synthase with modified bilanes.* Bioorg. Med. Chem. Lett. 4:1105-1110 (1994).
- ⁴⁸ Hart G. J., Battersby A. R. *Purification and properties of uroporphyrinogen III synthase (co-synthetase) from Euglena gracilis.* Biochem. J. 232:151-160 (1985).
- ⁴⁹ DeLano W. L. *The Pymol molecular graphics system.* San Carlos, CA: DeLano Scientific; 2002.
- ⁵⁰ Battersby A. R., Fookes C. J. R., McDonald E., Meegan M. J. *Biosynthesis of type-III porphyrins: proof of intact enzymatic conversion of the head-to-tail bilane into uro'gen-III by intramolecular rearrangement.* J. Chem. Soc. Chem. Commun. 185-186 (1978).
- ⁵¹ Mathewson J. i Corwin A. *Biosynthesis of pyrrolepigments: a mechanism for porphobilinogen polymerization.* J. Am. Chem. Commun., 1313-1315 (1961).
- ⁵² Leeper F. J. *The evidence for a spirocyclic intermediate in the formation of uroporphyrinogen III by cosynthase.* Ciba Found. Symp., 180:111-123 (1994).
- ⁵³ Pichon C., Atshaves B. P., Stolowich N. J. i Scott A. I. *Evidence for an intermediate in the enzymatic formation of uroporphyrinogen III.* Bioorg. Med. Chem. 2:153-168 (1994a).

-
- ⁵⁴ Stark W. M., Hart G. J., i Battersby A. R. *Synthetic studies on the proposed spiro intermediate for biosynthesis of the natural porphyrins: inhibition of cosynthase*. J. Chem. Soc. Chem. Commun., 465 (1986).
- ⁵⁵ Cassidy M. A., Crockett N., Leeper F. J., i Battersby A. R. *Synthetic studies on the proposed spiro intermediate for biosynthesis of the natural porphyrins: the stereochemical probe*. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 6:384–386 (1991).
- ⁵⁶ Pretsch E.; Bühlmann P.; Affolter C.; Herrera A.; Martínez R. *Determinación estructural de compuestos orgánicos*. Springer (2001).
- ⁵⁷ Saunders M.; Wishnia A.; Kirkwood J. G. *The nuclear magnetic resonance spectrum of ribonuclease*. JACS, 79, 12:3289, (1957).
- ⁵⁸ Shulman R. G.; *Biological NMR Spectroscopy*; Edited by Markley J. L., and Opella S. J.; Oxford University Press (1997).
- ⁵⁹ Jardetzky O.; Pappas P.; Wade N. G. *Proton Magnetic Resonance Studies o Purine and Pyrimidine Derivatives. IX. The Protonation of Pyrimidines in Acid Solution*. JACS, 85, 11:1657 (1963).
- ⁶⁰ McDonald C. C.; Phillips W. D. *In Magnetic Resonance in Biological Systems; Ehrenberg, A.; Malmström, B. G.; Vänngård, T.*; Eds. Pergamon: Oxford, p 3 (1967).
- ⁶¹ Gibbons W. A.; Crepaux D.; Delayre J.; Dunand J.-J.; Hajdukovic G.; Wyssbrod H. R. *In Peptides: Chemistry, Structure and Biology; Walter R., Meienhofer J.*, Eds.; Ann Arbor Sci., New York, p 127 (1976).
- ⁶² Kline A. D.; Braun W.; Wüthrich K. *Determination of the complete three-dimensional structure of the alpha-amylase inhibitor tendamistat in aqueous solution be nuclear magnetic resonance and distance geometry*. J. Mol. Biol. 204, 3:675-724 (1988).
- ⁶³ Wang A. C.; Grzesiek S.; Tschudin R.; Lodi P. J.; Bax A. *Sequential backbone assignment of isotopically enriched proteins in D₂O by deuterium-decoupled HA(CA)N and HA(CACO)N*. J. Biomol. NMR, 5, 4:376-382 (1995).
- ⁶⁴ Pervushin K.; Riek R.; Wider G.; Wüthrich K. *Attenuated T₂ relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution*. PNAS. 94:12366-12371 (1997).
- ⁶⁵ Omata, Y., Sakamoto, H., Higashimoto, Y., Hayashi, S., and Noguchi, M. *Purification and characterization of human uroporphyrinogen III synthase expressed in Escherichia coli*. J. Biochem. 136, 211–220 (2004).
- ⁶⁶ Cunha, L., Kuti, M., Bishop, D. F., Mezei, M., Zeng, L., Zhou, M. M., and Desnick, R. J. *Human uroporphyrinogen III synthase: NMR-based mapping of the active site*. Proteins 71, 855–873 (2007).
- ⁶⁷ Phillips G. *Green fluorescent protein - a bright idea for the study of bacterial protein localization*. FEMS Microbiol. Lett. 204, 1:9–18 (2001).

- ⁶⁸ Shimomura O., Johnson F., Saiga Y. *Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea*. J. Cell. Comp. Physiol. 59: 223–39 (1962).