

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.

IV. Resultats i Discussió

ÍNDEX

IV.1. Caracterització dels dos enzims humans recombinants U3S i PBGD.....	89
IV.1.1. Obtenició dels enzims PBGD i U3S salvatges.....	89
IV.1.1.1. Clonació, expressió i purificació de l'enzim PBGD.....	89
IV.1.1.2. Expressió i purificació de l'enzim U3S.....	94
IV.1.2. Caracterització per RMN dels enzims PBGD i U3S salvatges.....	95
IV.1.3. Determinació de l'estabilitat cinètica de l'enzim U3S.....	99
IV.1.4. Assaig enzimàtic conjunt dels enzims PBGD i U3S.....	105
IV.2. Cercant l'origen de la patogenicitat de mutants de la U3S.....	109
IV.2.1. Obtenició de les proteïnes mutants.....	109
IV.2.1.1. Comparativa dels rendiments d'expressió.....	110
IV.2.2. Caracterització de l'activitat enzimàtica de les proteïnes mutants.....	112
IV.2.3. Caracterització per RMN.....	115
IV.2.4. Determinació de l'estabilitat cinètica de les proteïnes mutants.....	117
IV.2.4.1. La tercera hèlix de la U3S, un punt clau en l'estabilitat de l'enzim.....	119
IV.2.5. Anàlisi conjunt de l'activitat i l'estabilitat <i>in vitro</i> en el context de la PEC.....	122
IV.3. Estudis <i>in vivo</i> dels enzims humans U3S salvatge i del mutant patogènic	
U3S-C73R.....	127
IV.3.1. Disseny de les construccions.....	127
IV.3.1.1. L'enzim U3S sense proteïnes de fusió.....	127
IV.3.1.2. L'enzim U3S amb la proteïna de fusió <i>myc</i>	128
IV.3.1.3. L'enzim U3S amb la proteïna de fusió EGFP	128
IV.3.2. Efectes de la mutació C73R en l'expressió de la U3S en eucariotes.....	129
IV.3.2.1. Comparació del nivell de transcripció del gen salvatge i del gen C73R...	130
IV.3.2.2. Comparació del nivell de traducció del gen salvatge i del gen C73R	133
IV.3.3. Efectes de la mutació C73R en la localització cel·lular de la U3S en eucariotes.....	135
IV.3.3.1. Localització en cèl·lules transfectades.....	135
IV.3.4. Efectes de xaperones químiques i de l'inhibidor del proteasoma MG132 en l'expressió i localització cel·lular de la U3S en eucariotes.....	139
IV.3.4.1. Anàlisi per microscòpia òptica.....	139
IV.3.4.2. Anàlisi per immunotransferència de proteïnes.....	143
IV.3.4.3. Anàlisi per citometria de flux.....	147
BIBLIOGRAFIA CAPÍTOL IV.....	149

IV.1. CARACTERITZACIÓ DELS DOS ENZIMS HUMANS RECOMBINANTS U3S I PBGD

IV.1.1. Obtenció dels enzims PBGD i U3S salvatges

IV.1.1.1. Clonació, expressió i purificació de l'enzim PBGD

En humans, es coneixen 2 isoformes de l'enzim porfobilinogen desaminasa (Figura IV.1), tal i com es detalla en l'apartat I.1: la isoforma 1, formada per 361 residus (NP_000181) i la isoforma 2 constituïda per 344 residus (NP_001019553).

```

Isoforma_1      MSGNGNAAATAEENS PKMRVIRVGRKSQLARIQTDSVVATLKASYPGLQFEI IAMSTTG 60
Isoforma_2      -----MRVIRVGRKSQLARIQTDSVVATLKASYPGLQFEI IAMSTTG 43
                *****

Isoforma_1      DKILD TALS KIG EKSLFTKELEHALEKNEVDLVVHSLKDLPTVLP PGFTIGAICKRENPH 120
Isoforma_2      DKILD TALS KIG EKSLFTKELEHALEKNEVDLVVHSLKDLPTVLP PGFTIGAICKRENPH 103
                *****

Isoforma_1      DAVVFHPK FVGK TLET LPEKSVVGTSSLRRAAQLQRKFP HLEFRSIRGNLNTRLRKLDEQ 180
Isoforma_2      DAVVFHPK FVGK TLET LPEKSVVGTSSLRRAAQLQRKFP HLEFRSIRGNLNTRLRKLDEQ 163
                *****

Isoforma_1      QEFSAI I LATA GLQRMGWHNRVGT I LHPEECMYAVGQGALGVEVRAK DQDILD LVGV LHD 240
Isoforma_2      QEFSAI I LATA GLQRMGWHNRVGT I LHPEECMYAVGQGALGVEVRAK DQDILD LVGV LHD 223
                *****

Isoforma_1      PETLLR C IAERA FLRHLEGGCSVPVAVHTAMKDGQLYLTGGVWSLDGSDSIQETMQATI H 300
Isoforma_2      PETLLR C IAERA FLRHLEGGCSVPVAVHTAMKDGQLYLTGGVWSLDGSDSIQETMQATI H 283
                *****

Isoforma_1      VPAQHEDGPEDDPQLVGITARNIPRGPQLAAQNLGISLANLLLSKGAKNILDVARQLNDA 360
Isoforma_2      VPAQHEDGPEDDPQLVGITARNIPRGPQLAAQNLGISLANLLLSKGAKNILDVARQLNDA 343
                *****

Isoforma_1      H 361
Isoforma_2      H 344
                *

```

Figura IV.1. Alineació de seqüències de les dues variants de la proteïna PBGD que es coneixen en humans: la isoforma 1 (361 residus), la isoforma 2 (344 residus), emprant el programa lliure d'alineament múltiple de seqüències ClustalW2, versió 2.0.12.¹

El primer intent de **clonació** d'un fragment d'*ADNc* codificant per la **PBGD humana** es va realitzar amb el clon proporcionat per la *Unitat de Transcriptòmica del Parc Científic de Barcelona*. El fragment d'*ADNc* que codificava per la PBGD estava clonat en el vector pT7T3D-Pacl entre les seqüències complementàries als encebadors M13(-21) i T7prom (veure Taula III.3). El resultat de la seqüenciació d'aquest fragment d'*ADNc* va indicar que es tractava del clon CR590157² de 1766pb, definit com a *ADNc* complet del clon CS0DM006YE24 de fetge fetal d'*Homo sapiens*. Aquest clon és pràcticament idèntic a la isoforma 2 de la PBGD, amb la diferència que en el clon es produeix un procés de maduració diferent en l'ARNm donant lloc a la retenció de l'intró (part no codificant de la seqüència d'*ADN*) localitzat entre els exons 10 i 11. Donat que aquesta seqüència no correspon a l'enzim de interès, no es va continuar amb la seva subclonació.

Posteriorment, es va obtenir un fragment d'ADN corresponent a la PBGD humana codificant per la variant 2 de la PBGD (344 residus), segons la casa comercial, clonat en el vector pCMV6-XL4 (Origen). Els resultats de la seqüenciació tornaven a revelar la seqüència del clon CR590157 del gen de la PBGD. Aquesta mostra també es va desestimar.

Finalment es va adquirir el clon per la proteïna PBGD de la casa comercial *Invitrogen* que codifica per la isoforma 1 de la PBGD humana (361 residus), que es va decidir anomenar *HPBGD_361invi*. La seva seqüenciació va corroborar l'existència de la isoforma d'interès. Es va escollir el vector pETM-11 per inserir-hi la seqüència, i es decidí fer la digestió amb els enzims *NcoI* i *HindIII*, 2h a 37 °C. En la Figura IV.2 es recullen els resultats d'aquesta digestió: als carrils 2 i 3 del gel s'observa el vector pETM-11 sense digerir. En els carrils 4 i 5 s'obtenen dues bandes per carril, corresponents al producte de digestió, un fragment de 5325 pb i un fragment de 704 pb.

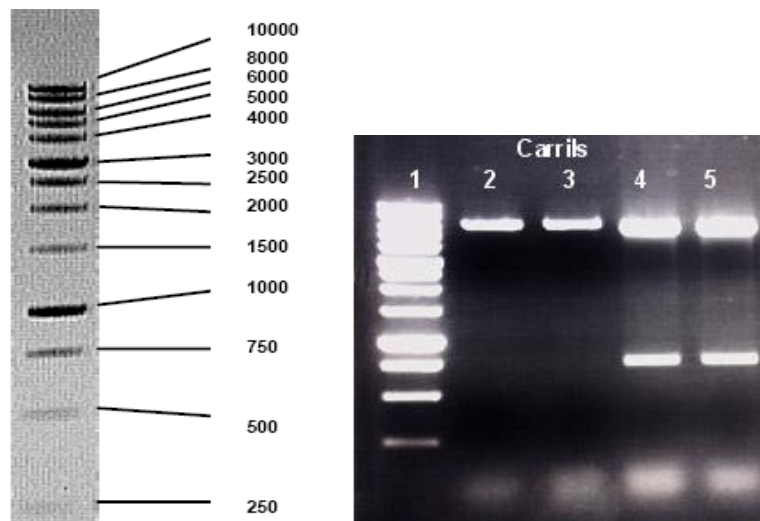


Figura IV.2. Digestió del vector pETM-11 amb els enzims *NcoI* i *HindIII* resulta en un gel d'agarosa a l'1%. Carril 1: marcadors de pes molecular d'1 kb de Biotools (detallats a la figura de l'esquerra). Carrils 2 i 3: vector sense digerir. Carrils 4 i 5: digestió del vector amb *NcoI* i *HindIII*, 2h a 37 °C.

Un cop digerit el vector amb els enzims de restricció *NcoI* i *HindIII*, es van realitzar lligacions amb el fragment d'ADN *HPBGD_361invi*, prèviament amplificat per PCR amb els encebadors PBGDpETM-11d i HPBGDinvers (Taula III.3).

La seqüenciació es va aconseguir emprant un *kit* de seqüenciació per a seqüències complexes (*dGTP Big Dye Terminator Ready Reaction*).³ Generalment en les reaccions de seqüenciació es sol utilitzar una barreja de deoxinucleòtids que conté deoxiinosina trifosfat (dITP), enlloc de la seva anàloga, la deoxiguanosina trifosfat (dGTP) ja que la primera redueix l'efecte de les compressions que tenen lloc com a conseqüència d'una mobilitat no uniforme dels fragments en gels de poliacrilamida, degut a la formació de zones d'estructura secundària

en l'ADN monocatenari, en aquelles regions que presenten complementarietat dins de la pròpia cadena. Aquestes zones apareixen en la seqüència com a dos o més fragments de diversa longitud, migrant amb mobilitat semblant (s'observa en el cromatograma pics superposats i espaiat no uniformes). El dITP no aparella tant fortament amb els residus de citosina, com el dGTP, però la utilització de dGTP permet augmentar tant la temperatura d'extensió a 72 °C (mentre que amb la utilització de dITP sol ser de 60 °C) com la temperatura d'aparellament a 68 °C (en el cas de la química amb dITP s'utilitza a 50 °C), mesures que s'han vist francament útils en la seqüenciació de mostres amb alt contingut amb GC i/o amb facilitat per formar estructures secundàries.

Finalment, es va corroborar que el clon de la PBGD estava inserit correctament dins del vector pETM-11.

Per a l'**expressió del gen de la PBGD**, s'ha clonat la construcció pETM-11 amb la PBGD en cèl·lules *Escherichia coli*, en concret en la soca (població de cèl·lules que deriven d'un mateix organisme) BL21(DE3).⁴ Aquesta soca presenta la particularitat que en el gen *int* del genoma bacterià hi ha inserit el bacteriòfag (virus l'hoste del qual és un bacteri) DE3, derivat del fag λ , la qual cosa implica que el gen *int* resta inactivat i per tant, que el bacteriòfag DE3 queda com a lisogen estable (és a dir, el bacteriòfag no pot ni escindir-se del genoma bacterià ni tornar a integrar-se, per tant es reproduirà amb el genoma i passarà a les generacions successives). El bacteriòfag DE3 conté un fragment d'ADN amb el promotor *lacUV5*, corresponent a un fragment inicial del gen *lacZ* i el gen que codifica per l'ARN polimerasa de T7. En aquestes condicions, l'únic promotor capaç de conduir la transcripció del gen de l'ARN polimerasa de T7 és el promotor *lacUV5*, el qual és induïble per isopropil- β -D-tiogalactopiranosid, IPTG. En afegir IPTG en un cultiu d'aquesta soca en fase de creixement, es transcriu l'ARN polimerasa de T7, que és l'encarregada de transcriure el fragment d'ADN que ha estat clonat darrera del promotor reconegut per aquesta polimerasa, el promotor de tipus T7/*lac*, com el que tenen els vectors de clonació pET.

Les cèl·lules d'*E. coli* poden créixer ràpidament en medi mínim que contingui glucosa i clorur amònic (com a fonts controlades de carboni i de nitrogen), així com en medi ric que els hi proporciona aminoàcids, precursors de nucleòtids, vitamines, i d'altres metabòlits que en cas contrari les cèl·lules haurien de sintetitzar. La seva reproducció té lloc a partir de la divisió de a cèl·lula progenitora en dues cèl·lules descendents, que tindran la mateixa càrrega genètica que la cèl·lula mare (excepte en casos d'alteracions del material genètic durant la divisió, però en general les cèl·lules tenen mecanismes per contrarestar-ho).

Per fer créixer un cultiu cel·lular d'*E. coli*, s'*inocula* un petit nombre de cèl·lules en un medi líquid estèril. Després de un primer període de temps anomenat fase de *latència*, les cèl·lules inicien la divisió (veure Ffigura iv.3). En medis rics, com el medi LB de Lennox, les cèl·lules es

dupliquen cada 20 o 30 min. Aquesta fase es coneix com a fase *exponencial*, o fase *log*. Quan la densitat cel·lular augmenta fins al punt en què els nutrients o l'oxigen s'esgoten, o quan els productes de desfeita (com els àcids) de les cèl·lules augmenten molt, el creixement cel·lular es veu inhibit. En condicions normals de laboratori, aquest estat s'assoleix quan el cultiu cel·lular arriba a $1-2 \times 10^9$ cèl·lules/mL i aleshores el creixement del cultiu s'alenteix i deixa de ser exponencial. A aquesta fase se la coneix com a fase de *saturació*, o fase *estacionària*. Durant aquesta fase la densitat cel·lular es manté constant, ja que les cèl·lules que aconsegueixen dividir-se emmascaren aquelles cèl·lules del cultiu que moren. Si la fase estacionària s'allarga prou, aleshores el cultiu acaba morint, disminuint així la densitat del cultiu.

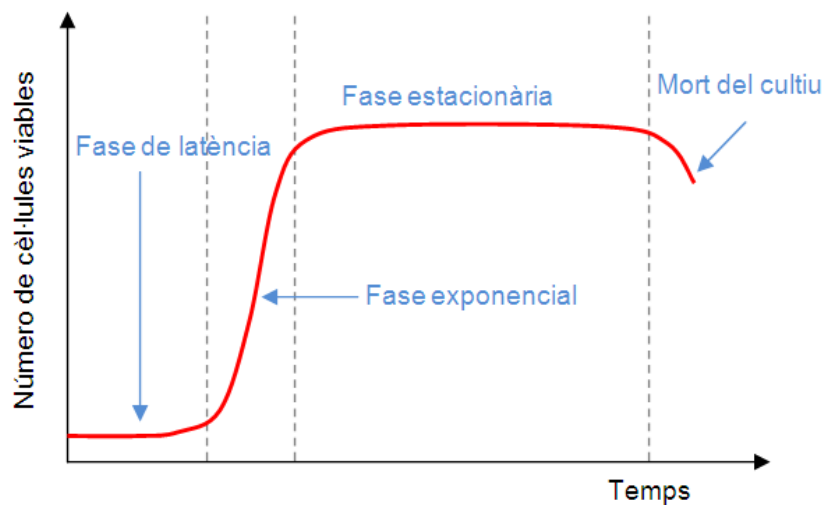


Figura IV.3. Esquema de les diferents etapes d'un cultiu cel·lular d'*E. coli*.

Per incrementar el rendiment de producció biològica d'una proteïna, es fa créixer el cultiu cel·lular fins que arriba a la fase exponencial, fet que assegura que les cèl·lules estan creixent i que per tant el metabolisme cel·lular funciona adequadament (quan el cultiu creix massa lent, pot indicar problemes de viabilitat cel·lular, entre d'altres). Arribats a aquesta fase, s'*indueix* el cultiu afegint IPTG al medi de cultiu. L'IPTG activa la expressió proteica codificada en el fragment clonat en un vector d'expressió. Com que l'IPTG és un anàleg de la galactosa que no pot ser hidrolitzat per la cèl·lula, la concentració d'IPTG no canvia durant l'expressió. L'IPTG s'utilitza per induir l'expressió dels fragments d'ADN clonats sota el control de l'operó *lac*.

Les cèl·lules d'*E. coli* requereixen condicions aeròbies de creixement, per la qual cosa s'utilitzen agitadors orbitals termoregulats en els quals es puguin agitar vigorosament els cultius (150-250 rpm). La temperatura òptima de creixement del bacteri *E. coli* és de 37°C, però sovint l'expressió de gens recombinants impliquen modificar les condicions durant la expressió. Algunes d'aquestes modificacions, com pot ésser disminuir la temperatura del cultiu abans d'afegir l'agent inductor i durant l'expressió de la proteïna, o augmentar l'agitació del cultiu, o allargar o disminuir el temps de biosíntesis de la proteïna d'interès, poden ser determinants pel

què fa a obtenir un producte soluble o un agregat que precipiti, i sovint sigui difícil de recuperar. En el cas de la PBGD es tracta d'una proteïna termoestable (s'ha observat que no agrega a temperatures de fins a 65 °C), i que no presenta toxicitat per a les cèl·lules *E. coli* BL21(DE3), per tant, la seva expressió s'ha dut a terme a 37 °C, durant 3 h amb agitació constant de 200 rpm, i a una concentració d'agent inductor IPTG de 0.5 mM..

Per poder fer la monitorització del creixement es mesura la absorbància a 600 nm (A_{600}). Un cultiu crescut en medi ric (LB) compleix que cada 0,1 unitats d' A_{600} (també expressada com a densitat òptica) equivalen a 1×10^8 cèl·lules/mL, i s'estableix, en aquests mateix tipus de medi de creixement, que el cultiu està en fase exponencial a una densitat òptica de 0,7 unitats d' A_{600} . En el cas de medi mínim M9 + glucosa, el cultiu es troba en fase exponencial quan la seva densitat òptica és de 0,5.

En la **purificació de la PBGD** (42.6 kDa de pes molecular i 389 residus amb la cua d'histidines) s'han emprat tres protocols diferents (veure apartat **III.1.4.2.**) amb l'objectiu d'aconseguir mostres de l'enzim suficientment concentrades, pures i aptes tant per als estudis per RMN com per als estudis d'activitat enzimàtica. El **protocol 1** consta de dues parts: el protocol 1.A es tracta és una modificació del protocol publicat pels autors Shoolingin-Jordan, Butler i col·laboradors l'any 2003⁵, mentre que el protocol 1.B està basat en la termoestabilitat de la PBGD com a característica que permet escalfar la mostra per eliminar gran part dels components cel·lulars; aquests, com que són inestables tèrmicament, precipitaran en escalfar la mostra. El **protocol 2** s'ha dissenyat amb base del vector emprat per clonar el fragment codificant per la PBGD humana, el vector pETM-11, que incorpora una seqüència de poli-histidines a l'extrem N-terminal de la proteïna inserida. El **protocol 3** és una modificació del protocol 2 que permet obtenir mostres de PBGD amb el seu cofactor unit, ja que emprant imidazol enlloc de l'agent quelant EDTA la proteïna no perd el seu cofactor. Aquest tercer protocol és el que ha permès l'obtenció d'una major quantitat de proteïna pura, proporcionant mostres de 3.8 mg d'enzim PBGD pur per litre de cultiu.

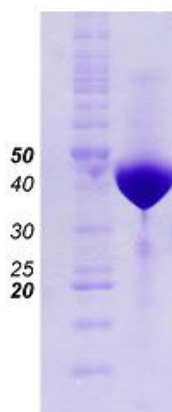


Figura IV.4. Electroforesi en gel de poliacrilamida i SDS amb la proteïna PBGD purificada (389 residus amb la cua d'histidines, pes molecular 42.6 kDa).

IV.1.1.2. Expressió i purificació de l'enzim U3S

Tal i com s'ha comentat a l'apartat III.1, el gen de l'enzim U3S ha sigut proporcionat pel laboratori del Professor J. Phillips de la Universitat de Utah, USA, clonat en un vector pET-16 modificat. La proteïna U3S (286 residus i 31.1 kDa de massa molecular amb la cua d'histidines) representa un difícil procés de purificació degut a la facilitat que presenta per agregar i precipitar. Amb aquesta premissa s'han hagut de realitzar modificacions al protocol inicial, a fi i a efecte d'obtenir la proteïna pura el més estable possible al llarg del temps. Un dels requisits és que calen unes condicions suaus d'expressió, és a dir, és necessari baixar la concentració de l'agent inductor, l'IPTG, a 0.5 mM, i realitzar el procés d'expressió amb els cultius incubats a 20 °C durant unes 12-16h. Seguint el protocol establert en l'apartat III.1.4.1. s'han aconseguit mostres d'entre 0.5 i 1.2 mg de proteïna pura U3S salvatge per litre de cultiu. El protocol citat inclou una extracció suau del contingut cel·lular mitjançant sonicació, que provoca la lisi de les cèl·lules per disrupció de les membranes lipídiques. Durant aquest procés es manté la mostra cel·lular en una solució amortidora amb 5 mM d'imidazol, que reduirà les interaccions inespecífiques del material cel·lular amb la resina de His-tag de níquel (Ni-NTA, Invitrogen). La proteïna U3S conté una seqüència d'histidines en un dels extrems que proporcionaran una elevada afinitat cap al níquel. D'aquesta manera, tots els components cel·lulars que no interaccionin amb la resina s'eluiran. Per poder separar la proteïna U3S unida a la resina s'utilitza una solució amortidora amb 500 mM d'imidazol, que permet el seu alliberament competint pel níquel.

Un cop eluïda la proteïna U3S de la columna d'afinitat es porta a terme la purificació emprant una columna d'exclusió molecular Superdex 75 (GE Healthcare), que separa els components de la mostra segons el seu pes molecular. Degut a la composició de la resina, les molècules de major pes molecular s'eluiran en primer lloc, mentre que els de menor pes molecular patiran un major temps de retenció dins de la columna.

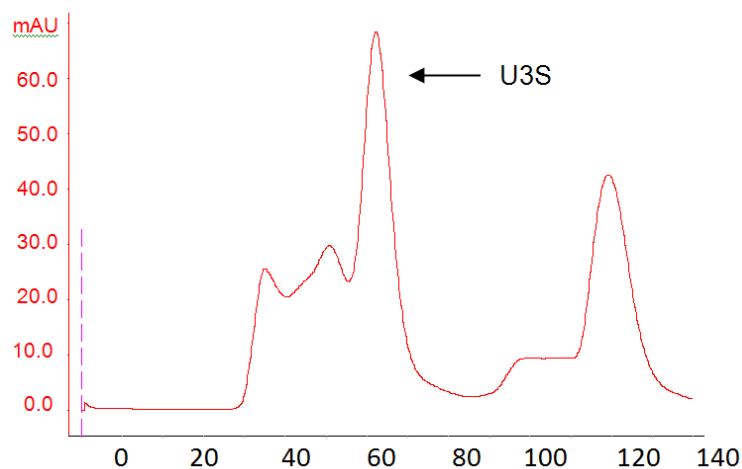


Figura IV.5. Perfil cromatogràfic d'una mostra de proteïna U3S separada per cromatografia d'exclusió molecular (Superdex 75) en règim isocràtic de 20mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.0.

Tal com s'observa en el cromatograma de la Figura IV.5, la mostra d'U3S que s'obté d'aquesta cromatografia conté una proporció de components contaminants. En analitzar aquestes fraccions s'observa que es tracta d'agregats proteics, segurament corresponents a la U3S, ja que en l'anàlisi per electroforesi desnaturalitzant amb SDS de les fraccions eluïdes s'obté una banda principal a l'alçada de la proteïna U3S.

En la Figura IV.6 s'observa la banda corresponent a la proteïna U3S un cop purificada. Per aconseguir la banda corresponent al monòmer de la proteïna ha calgut emprar DTT en el tampó de càrrega per reduir les cisteïnes presents en la U3S. En cas de no emprar cap agent reductor, la U3S apareix a la banda que correspondria al dímer en els gels d'electroforesi en acrilamida-SDS.

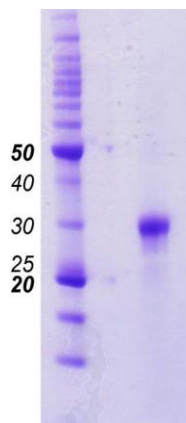


Figura IV.6. Gel d'electroforesi SDS amb la proteïna U3S salvatge purificada (286 residus amb la cua d'histidines i un pes molecular de 31.1 kDa).

IV.1.2. Caracterització per RMN dels enzims PBGD i U3S salvatges

Existeixen raons que fan pensar en la possibilitat de l'existència d'un complex PBGD-U3S, tal i com s'ha comentat en l'apartat I.5.1. Per intentar demostrar l'existència d'aquest complex s'ha emprat la ressonància magnètica nuclear, o RMN (apartat I.4.2.1.). Es tracta d'una tècnica espectroscòpica d'alta resolució adient per a l'elucidació de l'estructura tridimensional i la flexibilitat de les proteïnes⁶, l'estudi de les reorientacions segmentals de les mateixes⁷ i l'estudi del mecanisme catalític d'enzims. La RMN permet obtenir informació en solució, disposant d'un ampli ventall d'experiments per estudiar la dinàmica biomolecular a un gran nombre d'escales de temps. Existeixen exemples descrits a la literatura en els quals s'ha pogut establir un vincle entre la flexibilitat conformacional i la funció biològica de la proteïna.⁸

La característica principal de la RMN és que les freqüències de ressonància observades depenen dels ambients locals dels nuclis individuals. Les diferències en les freqüències de ressonància es coneixen com a desplaçament químic, i ofereix la possibilitat de distingir entre nuclis en ambients electrònics diferents. Així, existeixen petites variacions en les posicions exactes d'excitació per a cada nucli de la mateixa espècie química degut al seu entorn químic.

Les unitats del desplaçament químic són parts per milió, o ppm, i es determina a través de la següent relació:

$$\text{ppm} = \frac{(v_0 - v_{\text{ref}}) \times 10^6}{v_{\text{ref}}} \quad \text{Equació IV.1}$$

on v_0 és la freqüència del nucli a observar i v_{ref} és la freqüència de referència del nucli. El desplaçament químic de nuclis d'elements diferents varia en cents o mils de Hz; per tant, tots els nuclis d'un element específic s'observen en una regió relativament petita.

Quan s'obté un espectre de RMN d'una proteïna, els senyals s'eixamplen degut al moviment de rotació d'aquestes molècules respecte al medi. A menor pes molecular, més ràpida és la escala de temps del moviment i més fins són els senyals. Tanmateix, el gran nombre de senyals esperats a una proteïna de mida mitjana provoca la superposició dels desplaçaments químics, i els espectres monodimensionals d'una proteïna són difícils d'interpretar. L'obtenció d'espectres multidimensionals (en el que la complexitat de l'espectre bidimensional es resol amb dimensions addicionals) ajuda a extreure'n la informació rellevant. La representació gràfica d'un espectre monodimensional és una representació en dues dimensions. Un espectre 2D hauria de ser una representació en tres dimensions, però de fet, els espectre 2D es representen com a diagrames de contorns perquè la seva representació sigui de dues dimensions i es faciliti la seva interpretació, tal i com es mostra en la Figura IV.9.

Existeixen moltes variables que poden millorar les característiques d'un senyal en un espectre de RMN malgrat adquirir l'experiment amb els mateixos paràmetres. Algunes d'aquestes variables són: la temperatura (a major temperatura millor s'aconsegueix una millor senyal), la concentració de les mostres (més concentrades les mostres més senyal, però poden començar a haver-hi processos d'agregació) o la solució tampó emprada. Quan s'enregistren espectres de senyals que intercanvien amb el dissolvent a pH àcids (fins a pH 5.0) els senyals obtinguts són millors; la utilització de sals en el tampó poden afavorir la solubilitat d'algunes proteïnes si bé provoquen una disminució en la susceptibilitat magnètica). Així, modificant alguna d'aquestes variables és possible millorar els espectres a obtenir.

En la Figura IV.7 i la Figura IV.8 s'observen dos experiments HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence transfer) de la proteïna U3S enregistrats amb un espectrofotòmetre Bruker 800 MHz, a les mateixes condicions experimentals, però amb l'única variació de què en l'experiment representat a la Figura IV.8 s'ha afegit a la mostra els aminoàcids L-arginina (50 mM) i L-glutàmic (50 mM), els quals està descrit que disminueixen l'efecte de l'agregació i precipitació de les mostres.⁹

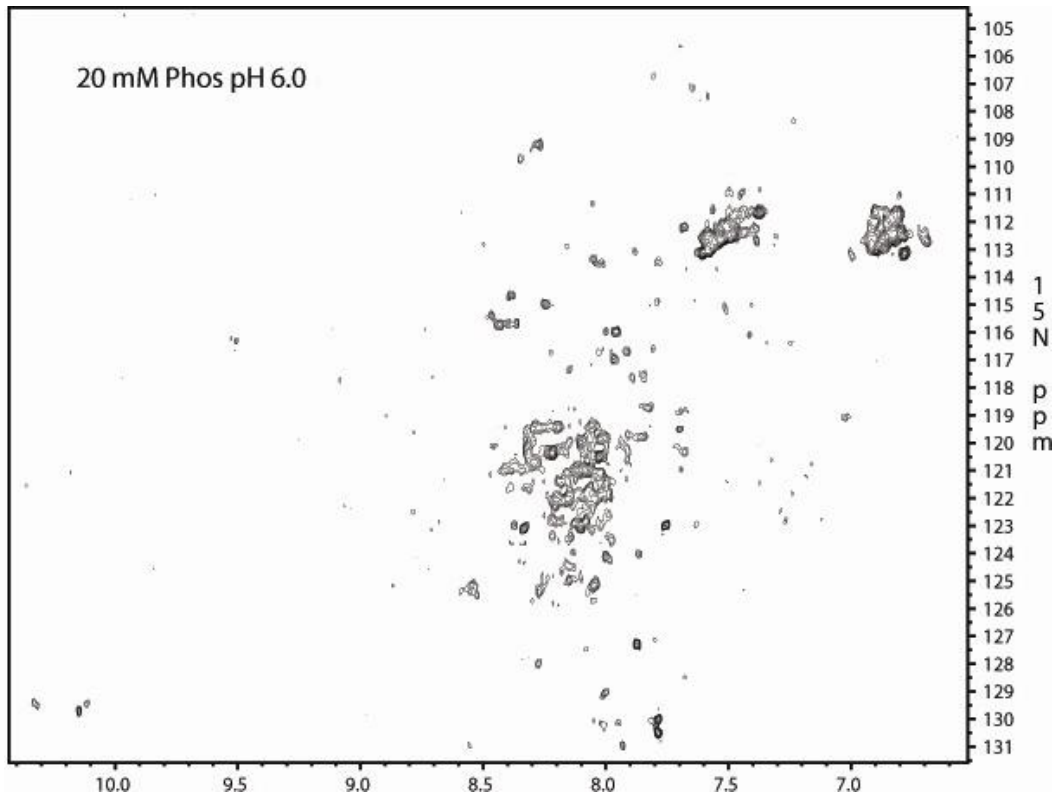


Figura IV.7. Espectre HSQC de la proteïna U3S en tampó fosfat 20 mM a pH 6.

A l'experiment HSQC sense els dos aminoàcids lliures L-arginina i L-glutàmic, els senyals de correlació heteronuclear mostren un espectre amb pèrdua de senyals i morfologia típica d'una espècie amb processos de desplegament. A la Figura IV.8 els diagrames de contorns que determinen cada un dels senyals són molt ben definits, i el patró de la U3S d'aquesta mostra és distintiu d'una proteïna ben plegada.

Experiments portats a terme per Golovanov i col·laboradors⁹ havien demostrat que una concentració de 50 mM de L-arginina i L-glutàmic en mostres proteiques evitaven l'agregació i la degradació d'un seguit de proteïnes, prèviament descrites com a proteïnes de difícils d'obtenir a elevades concentracions. Els autors de l'estudi apunten la dificultat d'explicar el mecanisme pel qual la solució d'Arg i Glu evita el procés d'agregació, però assumeixen que quan les proteïnes es troben en solució i se les sotmet a un procés d'augment de concentració aquest procés és guiat principalment per les interaccions de la superfície de l'estat plegat, en oposició a l'agregació dels nuclis hidrofòbics exposats de l'estat desplegat. A un pH neutre o lleugerament àcid, quan tant l'Arg com el Glu estan carregats. Aquests interaccionen (i emmascaren) els grups contràriament oposats de la superfície de la proteïna, mentre que les parts hidrofòbiques alifàtiques de les cadenes laterals de l'Arg i del Glu interaccionarien i cobririen les parts exposades adjacents hidrofòbiques de la superfície de la proteïna, reduint així l'adherència general que acaba causant l'agregació proteica.

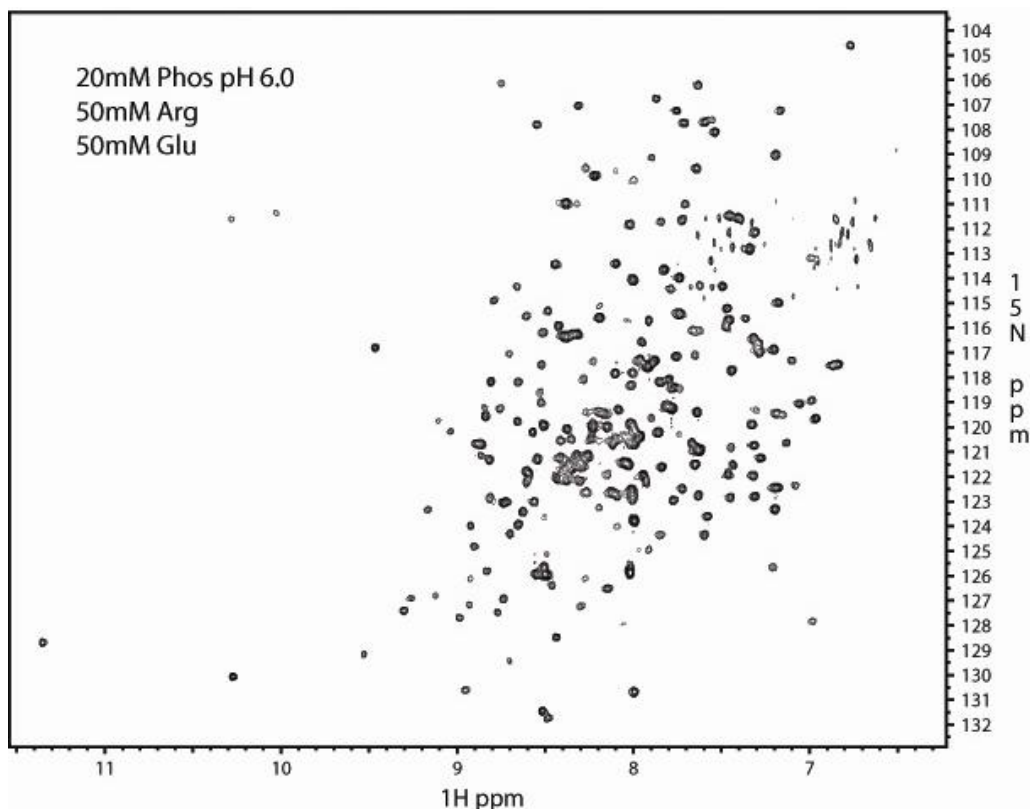


Figura IV.8. Espectre HSQC de la proteïna U3S, dissolta en tampó fosfat 20 mM, 50 mM L-Arginina i 50 mM L-glutàmic, a pH 6.0.

En aquest treball d'investigació es pretén verificar l'existència del complex mitjançant tècniques de RMN en solució. Partint d'una mostra d'U3S marcada isotòpicament amb ^{15}N (veure apartat III.1.3.) es va enregistrar l'espectre bidimensional HSQC protó i nitrogen de la mostra d'U3S en 20 mM de tampó fosfat, pH 7.5, i de la mateixa mostra amb presència de la proteïna PBGD sense marcatge isotòpic. En el primer cas (Figura IV.9) s'observa un espectre HSQC de la proteïna U3S etiquetada isotòpicament amb ^{15}N . El patró que s'observa presenta la típica dispersió de les senyals de desplaçament químic de proteïnes estructurades. En el segon experiment en presència de l'enzim PBGD, tot i que només és possible enregistrar els senyals de la ^{15}N -U3S, qualsevol pertorbació que la sintasa pateixi es reflectirà en un canvi en el patró de dispersió de les senyals

Els resultats (no mostrats) van corroborar els recent resultats publicats per Cunha, Desnick i altres col·laboradors:¹⁰ no existeix, en les condicions experimentals assajades, interacció entre la proteïna U3S i l'enzim que el precedeix en la ruta de biosíntesi del grup hemo, la proteïna PBGD. Aquest resultat difereix d'estudis preliminars realitzats al nostre laboratori a l'inici de la present tesi i que apuntaven cap a una possible interacció entre les dues proteïnes. S'observà, però, que els canvis en els senyals dels desplaçaments químics de l'espectre HSQC de la U3S eren deguts a l'excés del dipirrometà HMB, precursor de la U3S, en la mostra. Per tant, en les condicions en què s'ha realitzat l'experiment, no s'observa interacció entre les dues proteïnes

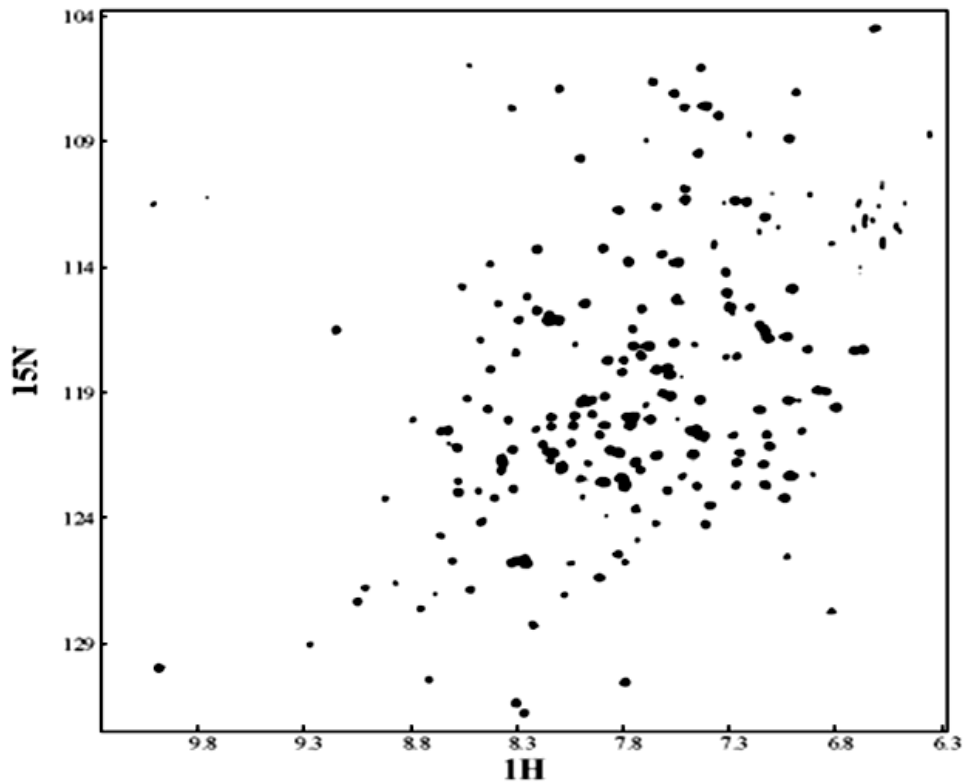


Figura IV.9. HSQC a 25 °C de la ^{15}N -U3S salvatge a 250 μM de concentració final, en 20 mM fosfat pH 7.5.

IV.1.3. Determinació de l'estabilitat cinètica de l'enzim U3S

Com ja s'ha comentat a la introducció, el dicroisme circular (CD) resulta sensible a l'estructura secundària de les proteïnes. El CD es pot fer servir per a determinar un dels paràmetres termodinàmics utilitzats per a definir l'estabilitat tèrmica¹¹ d'una proteïna: la temperatura de fusió (T_m), que es defineix com la temperatura a on la meitat de la proteïna està desplegada. Les corbes de desnaturalització tèrmica per a la U3S es presenten a la Figura IV.10. Tal i com s'observa a la figura, en augmentar velocitat d'escaneig les corbes de desnaturalització es desplacen cap a temperatures més altes, resultant en una dependència del T_m amb la velocitat d'escalfament. Per tant, el valor de T_m no és un descriptor adient per a definir la estabilitat termodinàmica de la U3S.

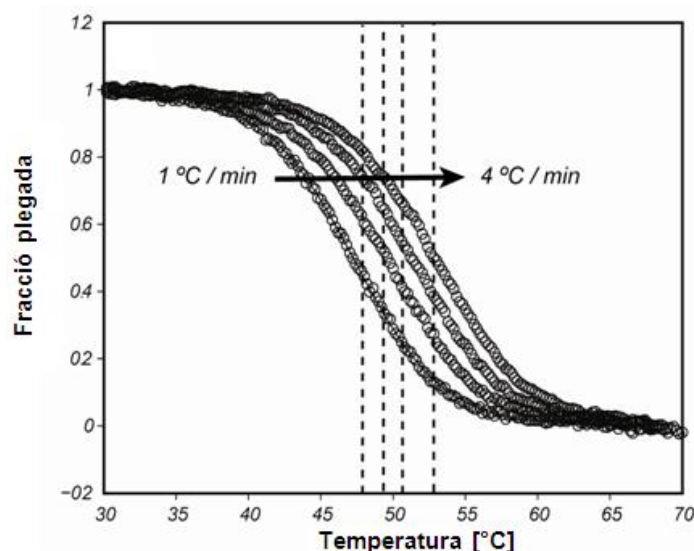
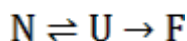


Figura IV.10. Corbes de desnaturalització tèrmica de la proteïna U3S salvatge a diverses velocitats d'escaneig (des de 1 a 4 graus/minut). S'han convertit els valors experimentals en fraccions plegades, emprant el mètode d'extrapolació lineal.¹² Les temperatures de fusió estan marcades amb les línies verticals discontinües per a cada velocitat d'escaneig.

La hipòtesi termodinàmica proposa que les conformacions natives de les proteïnes es troben en un estat de mínima energia respecte al global de tots els possibles estats que pot assolir la cadena peptídica. Les evidències experimentals que recolzen aquesta hipòtesi venen donades per la reversibilitat de les reaccions de desplegament i replegament de moltes proteïnes, normalment de mida petita.^{13,14} No obstant, en absència d'aquestes condicions de reversibilitat, l'existència d'alteracions irreversibles fan que la concentració de l'estat natiu sigui dependent del temps.¹⁵

Un elevat nombre de processos poden ser els responsables d'alteracions irreversibles *in vitro*, incloent l'agregació, autòlisis, i alteracions covalents de residus. En l'entorn cel·lular és d'esperar que aquestes alteracions irreversibles tinguin lloc a una taxa més elevada, ja que les proteïnes es troben en un ambient més carregat de biomolècules, la qual cosa pot afavorir la proteòlisi, la formació d'agregats o la interacció no desitjada amb d'altres components cel·lulars.

La desnaturalització proteica irreversible segueix, com a mínim, dos passos: la proteïna nativa (N) es troba en equilibri amb el seu estat desplegat (U, de l'anglès *unfolded protein*) que no és estable i evoluciona a un estat final (F), el qual és incapaç de retornar a l'estructura nativa de la proteïna (esquema IV.1).



Esquema IV.1

La conseqüència d'aquest fenomen és que el pas de l'estat desplegat (U) a l'estat final (F) serà un procés dependent del temps, i per tant, una equació de velocitat és el millor descriptor possible. Degut a l'existència d'aquest tercer estat final, el procés de desplegament de les

proteïnes que es comporten segons aquest model no poden ser descrites en termes d'equilibri termodinàmic, ja que la població de proteïna desplegada no es torna a replegar sinó que evoluciona cap a aquest tercer estat final, i per tant el sistema no està en equilibri.¹⁶

Emprant el dícroisme circular, s'ha enregistrat la variació en l'el·lipticitat al llarg del temps d'una mostra d'U3S a una concentració de 5 μM , entre 210 nm i 280 nm de longitud d'ona, a la temperatura constant de 41 °C. Els resultats es representen a la Figura IV.11, on es pot observar el decaïment del senyal de dícroisme al llarg del temps.

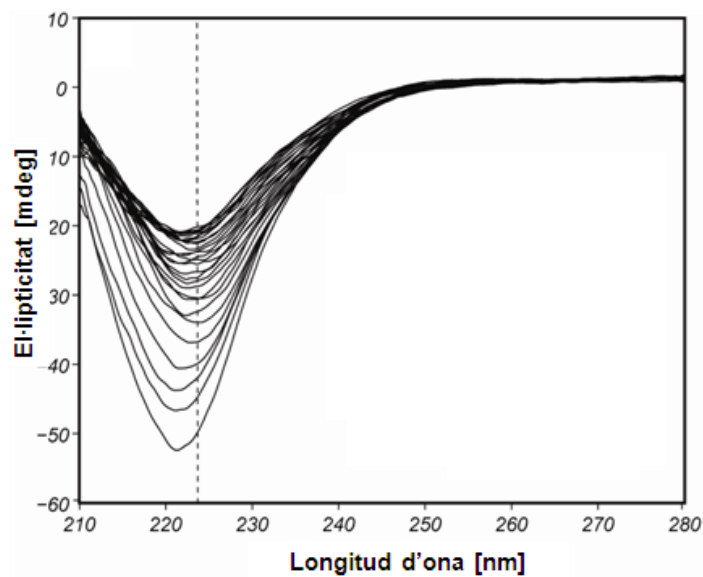


Figura IV.11. Resultats de la cinètica de desplegament de la proteïna U3S: s'observa el decaïment de la senyal respecte al temps per la proteïna U3S salvatge a 41 °C. La línia discontinua remarca els valors d'el·lipticitat a 222 nm.

Aquest experiment permet observar com la U3S *in vitro* pateix una pèrdua d'estructura al llarg del temps (reflectit en la disminució dels valors d'el·lipticitat, el decaïment dels quals és exponencial), i per tant, afirmar que es tracta d'una proteïna inestable al llarg del temps. A la Figura IV.12 s'han representat els valors de DC enregistrats a la longitud d'ona de 222 nm d'aquest mateix experiment, a partir dels quals s'ha calculat la constant de velocitat del decaïment del senyal.

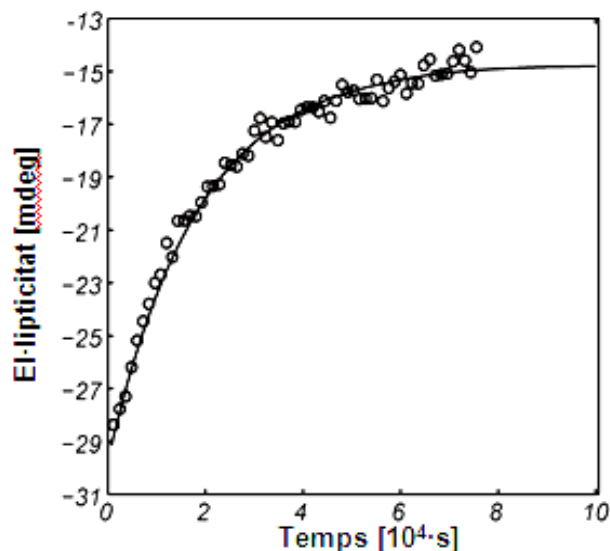
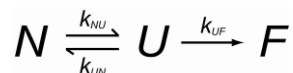


Figura IV.12. Cinètica de desplegament de la U3S enregistrada a 222 nm.

El decaïment en la senyal de dicroisme circular mostrat en la Figura IV.12 segueix un decreixement que pot ser caracteritzat per una velocitat cinètica aparent (k_{app} , veure l'equació 2).

$$I = I_0 \cdot e^{-t/k_{app}} \quad \text{[Equació IV.2]}$$

on k_{NU} , k_{UF} i k_{UN} son les velocitats d'evolució de l'estat natiu N a l'estat desplegat U, de l'evolució de l'estat desplegat U a l'estat final F, i la recuperació de l'estat desplegat U a l'estat natiu N, respectivament. Tal i com s'ha esmentat amb anterioritat, quan predomina l'estabilitat cinètica, el model que millor descriu el sistema és el model de tres estats i les velocitats cinètiques k_{NU} , k_{UN} i k_{UF} estan relacionades amb els processos de conversió indicats per les fletxes en l'Esquema IV.2:¹⁷



Esquema IV.2

on N és l'estat natiu i U és l'estat desplegat que evoluciona de forma espontània cap a un estat més estable (i sovint inactiu) o estat final F. Mesures per Difusió Dinàmica de la Llum (DDL o DLS, de l'anglès *Dynamic Light Scattering*) i observacions de mostres d'U3S incubades al llarg del temps revelen la formació de precipitats de proteïna, indicant que l'estat final F és

equivalent a una forma agragada en la U3S. La velocitat aparent k_{app} pren la forma general següent:

$$k_{app} = \frac{k_{NU} \cdot k_{UF}}{k_{UN} + k_{UF}} \quad [\text{Equació IV.3}]$$

on k_{NU} , k_{UF} i k_{UN} son les velocitats de desplegament, de replegament i d'evolució a l'estat final respectivament. Les velocitats cinètiques k_{NU} , k_{UN} i k_{UF} estan relacionades amb els processos de conversió indicats per les fletxes en l'Esquema IV.2. Quan la velocitat d'agregació (k_{UF}) és molt més gran que la velocitat de replegament (k_{UN}) la velocitat aparent és equivalent a la velocitat de desplegament ($k_{app} \approx k_{NU}$).¹⁸ I donades les raons que es detallen a continuació, aquesta aproximació és aplicable a la U3S:

(i) s'ha determinat la k_{app} a diverses concentracions de la proteïna; tenint en compte l'error experimental, es pot considerar que no hi ha canvis en les velocitats de decaïment en el rang de concentracions explorat (5-50 μM). Així, aquesta velocitat segurament representa un fenomen unimolecular de desplegament espontani enlloc de la transició multimolecular a l'estat final F.

(ii) s'ha seguit el procés d'agregació per espectroscopia de RMN, on el decreixement en les intensitats de les senyals no es veu acompanyat per canvis en el patró de l'espectre a les regions característiques de l'estat desplegat. Amb això es pot concloure que el procés de desplegament és el pas limitant per a la U3S amb una acumulació no significativa de l'estat desplegat, a concentracions de 5 μM .

A temperatura fisiològica, k_{NU} de la U3S salvatge equival a $1.63 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ corresponent a un temps de vida mitja de 61.1 h. S'ha decidit explorar la dependència de la temperatura amb la constant de velocitat de desplegament en el rang comprès entre 37 °C i 52 °C. Aquestes dades han estat analitzades assumint el model d'Arrhenius:

$$k_{NU} = A \cdot e^{-E_a/RT} \quad [\text{Equació IV.4}]$$

on E_a és la contribució entàlpica de l'energia d'activació i A és el factor de freqüència.

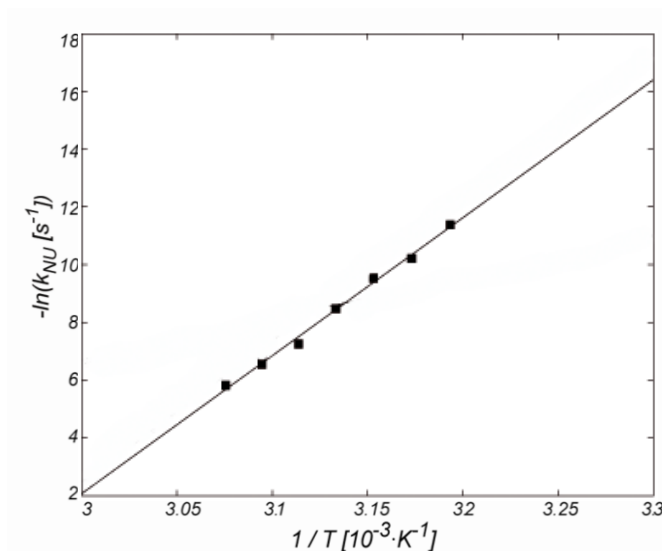


Figura IV.13. Representació gràfica d'Arrhenius per a les transicions de desplegament de la proteïna U3S salvatge mesurada amb espectroscòpia de diroisme circular. La línia representa la regressió lineal de les dades, emprada per obtenir l'energia d'activació (E_a).

Consistent amb l'equació IV.4, la representació gràfica del $\ln(k_{NU})$ respecte $1/T$ dona lloc a una tendència lineal (quadrats negres en la Figura IV.13) que s'ha emprat per extreure la component entàlpica a l'energia d'activació per a la proteïna U3S salvatge: $101.5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. E_a explica la diferència energètica entre la conformació plegada activa (estat N) i la conformació d'energia més elevada en el procés de desplegament (veure Figura IV.14). En el cas de la U3S aquesta barrera energètica és elevada, i coincideix dins del rang de valors de les proteïnes que experimenten estabilitat cinètica.¹⁸

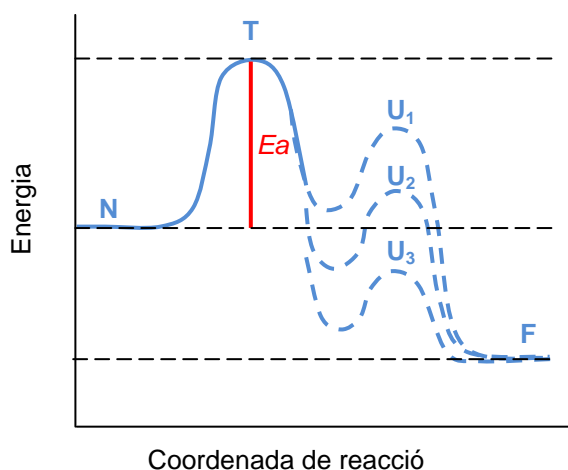


Figura IV.14. Representació de l'evolució d'un sistema de tres estats, on N és l'estat natiu, T l'estat de transició, U_n (on n és 1, 2 o 3) representa els possibles estats desplegats, i on F simbolitza l'estat final del sistema. L'estat de transició és el punt d'energia major en aquest model. L'energia d'activació (E_a) correspon a l'energia necessària que es requereix perquè el sistema evolucioni de l'estat natiu cap als estats desplegats i cap a un estat final F.

Per comprovar la consistència del model d'Arrhenius, els valors de E_a obtinguts han estat emprats per predir la dependència de la T_m amb la velocitat d'escaneig en els experiments de desnaturalització per temperatura mostrats en la Figura IV.10. Quan es mesuren experiments de desnaturalització tèrmica en proteïnes que pateixen estabilitat cinètica, la fracció plegada (FF) és una funció de la velocitat d'escaneig (r):^{19, 20}

$$FF(T, r) = \exp \left[-\frac{1}{r} \int_{T_0}^T A \cdot e^{-E_a/RT} dT \right] \quad [\text{Equació IV.5}]$$

on T_0 és qualsevol temperatura on es considera que la proteïna de la mostra roman plegada i T és la temperatura a considerar.¹⁶ L'equació 5 s'ha emprat per calcular els valors de T_m (on $FF = 0.5$) a diferents velocitats d'escaneig per a la U3S salvatge. En la Taula IV.1 es mostren els valors predits i els obtinguts de forma experimental per a la U3S salvatge:

$r / ^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$	Valor Predit de $T_m^{(a)} / ^\circ\text{C}$	Valor Experimental de $T_m^{(b)} / ^\circ\text{C}$
1	47.35	47.0 ± 0.8
2	48.73	48.8 ± 0.6
3	49.53	50.5 ± 0.7
4	50.11	52.2 ± 1.0

Taula IV.1. Comparació entre els valors de T_m aparents calculats i experimentals obtinguts a diferents velocitats d'escaneig. (a) Valors calculats emprant les dades experimentals per a A ($\ln A = 162.66$, en s^{-1}) i E_a ($101.5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$); el valor de T_0 s'ha assignat 0°C per als càlculs. (b) La incertesa experimental s'ha obtingut a partir de la duplicació de les dades.

La bona concordança entre els valors experimentals i els calculats validen l'ús del model d'Arrhenius per caracteritzar la cinètica de desplaçament de la U3S.

IV.1.4. Assaig enzimàtic conjunt dels enzims PBGD i U3S

La porfíria eritropoiètica congènita (PEC) està directament relacionada amb un mal funcionament de la biosíntesi del grup hemo, i més concretament, amb una pèrdua d'activitat enzimàtica de la U3S. L'alteració en l'activitat d'aquest enzim té com a conseqüència directa la disminució de la concentració intracel·lular de l'U3, essencial per a la síntesis del grup hemo.

Tot i que s'havia determinat l'activitat U3S en mostres de pacients, així com de cultius procarïotes que expressaven la proteïna, els resultats obtinguts per autors com Robert J. Desnick²¹ o Hubert de Verneuil²² diferien força entre ells, per la qual cosa es va decidir realitzar un assaig enzimàtic que fos reproduïble a qualsevol laboratori.

Per poder determinar l'activitat específica de la U3S s'ha utilitzat el mètode proposat per Jordan, i posteriorment modificat per Tsai i col·laboradors, i per Hart i Battersby.^{23, 24, 25} Per a la

detecció i mesura de la seva activitat cal tenir presents varies coses: en primer lloc, es tracta d'una proteïna l'activitat de la qual es troba directament relacionada amb el temps d'assaig, presentant una baixa estabilitat a temperatura fisiològica. En segon lloc, cal tenir en compte la inestabilitat del substrat de la U3S (l'HMB), el qual sense la intervenció de la sintasa evoluciona cap a una forma isomèrica, l'U1, que no pot ser emprat per a formar el grup hemo (veure Figura IV.15). I finalment, tenir present que es tracta d'un enzim humà, l'activitat del qual té lloc en un context cel·lular.

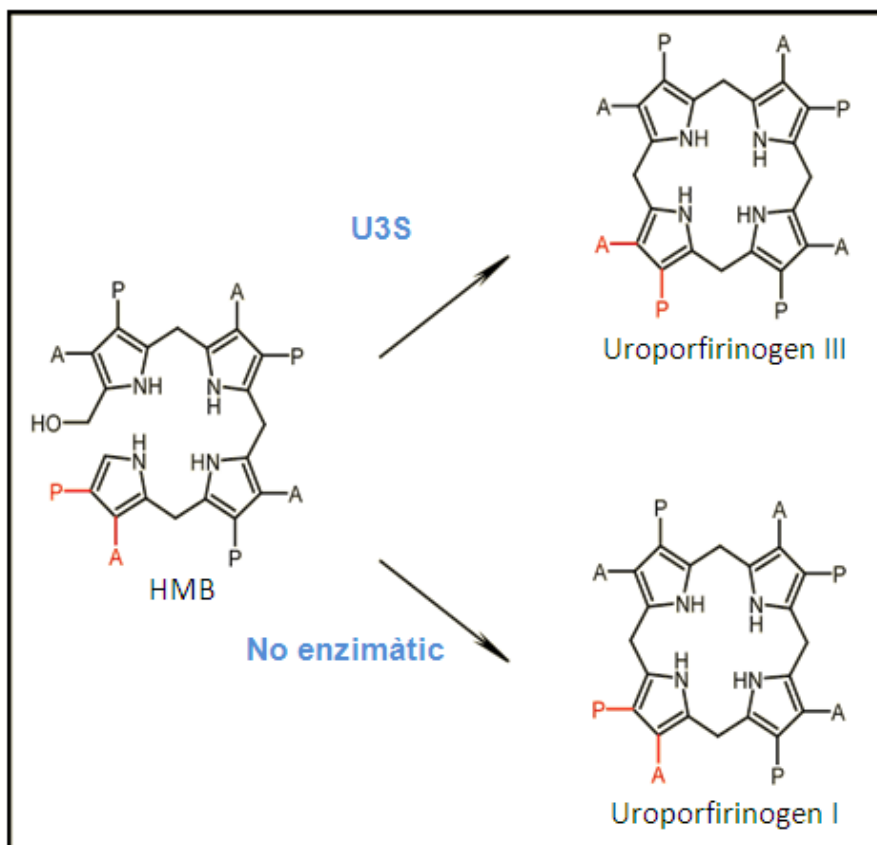


Figura IV.15. Esquema de la ciclació del preuroporfirinogen o hidroximetilbilà (HMB) catalitzada per la U3S per formar l'U3, i sense catalitzador, donant lloc a l'U1.

A continuació es presenta un esquema detallat de l'assaig enzimàtic emprat en la present tesi doctoral per a la determinació de l'activitat enzimàtica de la U3S (Figura IV.16). La base d'aquest mètode és la diferència en la velocitat d'evolució del preuroporfirinogen a uroporfirinogen III en presència de la U3S, que té lloc a una major velocitat que l'evolució espontània a uroporfirinogen I.

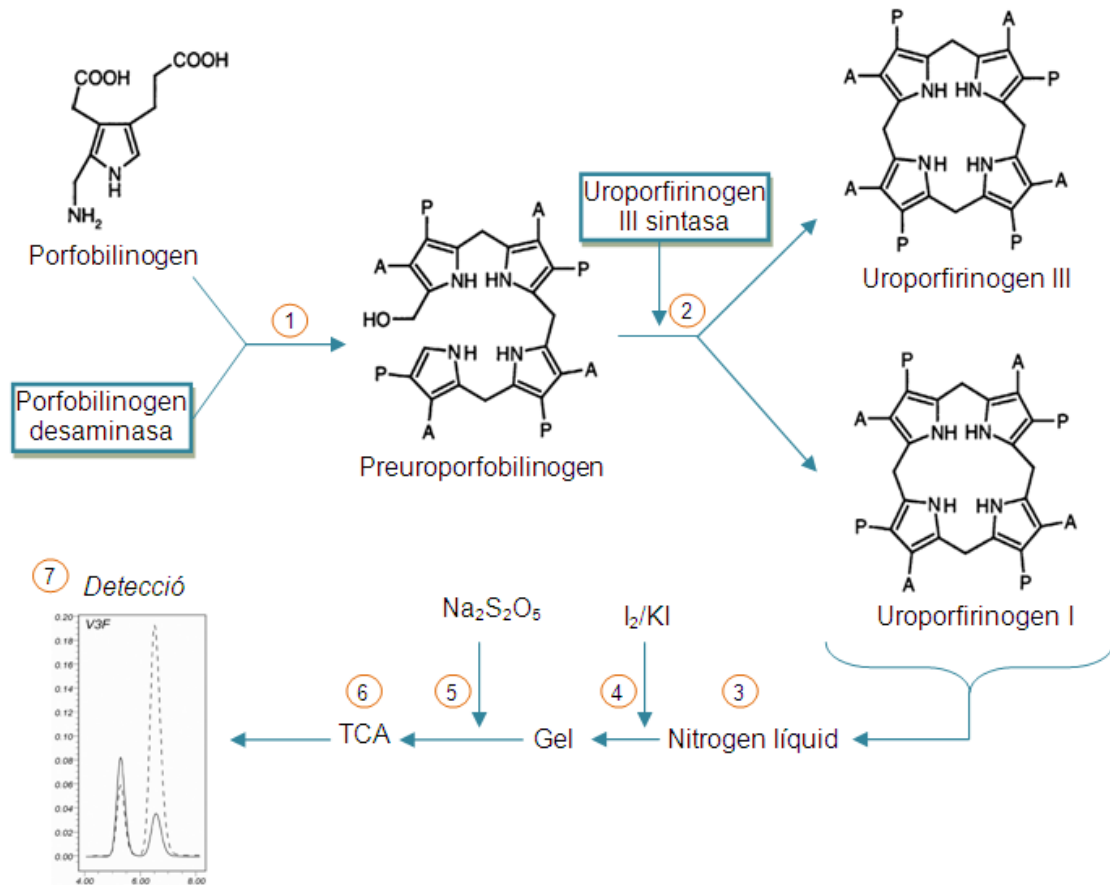


Figura IV.16. Esquema de l'assaig enzimàtic de la U3S. L'assaig s'inicia barrejant l'enzim PBGD amb el seu substrat, el PBG (1), perquè es formi el preuroporfirinogen, precursor de la U3S. Seguidament s'afegeix l'enzim U3S (2) perquè catalitzi la formació d'U3; i en aquest pas cal tenir present que es generarà certa quantitat de l'isòmer U1 per reacció no enzimàtica. S'atura la reacció de la sintasa submergint la mostra amb nitrogen líquid (3). Seguidament, s'afegeix una solució de iode que oxidarà els uroporfirinogens a uroporfirines (4), que són les molècules que se'n podrà detectar l'absorbància. L'excés de iode es redueix amb una solució saturada de metabisulfit sòdic (5), es precipiten les proteïnes amb TCA (6) i un pas de centrifugació permet obtenir la fracció soluble. Finalment, es mesura el nivell relatiu de les uroporfirines obtingudes.

Com s'ha comentat en l'apartat III.3., la separació dels uroporfirinogens I i III s'ha dut a terme mitjançant una cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) en fase reversa, prèvia oxidació d'aquests a les uroporfirines respectives. La fase reversa inclou qualsevol mètode cromatogràfic que utilitza una fase estacionària no polar, i en concret, la columna C18 emprada permet l'elució de compostos més polars en primer lloc, i la retenció dels compostos no polars. En el cas d'aquestes uroporfirines, es possible separar l'isòmer uroporfirina I de la uroporfirina III amb uns temps de retenció de 5.2 min i 6.3 min, respectivament (veure Figura IV.17). La solució isocràtica emprada és el tampó d'acetat amònic (pH 5.16)-acetonitril (87:13, v/v). La diferència d'elució entre els dos isòmers ve deguda al quart anell del tetrapirrol, que es troba

invertit entre els dos isòmers, i proporciona un entorn químic diferent, provocant així la possibilitat de separar-los amb una cromatografia d'alta resolució, com la emprada.

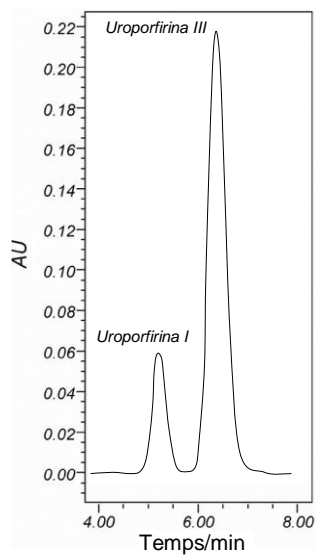


Figura IV.17. Cromatograma de HPLC de les uroporfirines resultants de l'assaig enzimàtic de l'enzim U3S salvatge. Elució isocràtica d'elució acetat amònic(pH 5.16)-acetonitril (87:13, v/v).

IV.2. CERCANT L'ORIGEN DE LA PATOGENICITAT DE MUTANTS DE LA U3S

IV.2.1. Obtenció de les proteïnes mutants

Tal i com s'ha comentat en l'apartat **I.3.2.**, les mutacions que s'han considerat en la present tesi són mutacions puntuals de l'enzim U3S, encara que en diversos estudis genètics d'afectats de porfíria eritropoiètica congènita s'ha vist que en alguns casos aquestes mutacions provenen de delecions, o insercions.²⁶ En la taula 1 de l'apartat **I.3.2.** es resumeixen les 25 mutacions puntuals patogèniques que s'han decidit estudiar en la present tesi, així com les referències dels casos reportats de pacients.

Clàssicament s'han utilitzat mètodes poc específics per generar proteïnes mutants, mitjançant alteradors químics de proteïnes (agents que reaccionen amb l'ADN, o agents intercalants) o irradiant l'organisme que conté la proteïna d'interès (per exemple, amb llum ultraviolada) i seleccionant aquells organismes que contenen la mutació desitjada de la proteïna d'interès.^{27, 28} Avui en dia es possible modificar el gen que codifica per una proteïna sistemàticament en llocs específics per generar pràcticament qualsevol tipus de mutació desitjada: **mutagènesi dirigida**.^{29, 30}

El procediment de mutagènesi dirigida parteix del gen d'interès clonat en un vector bacterià (que permet amplificar el material genètic). A partir de la seqüència coneguda del gen, es dissenyen els encebadors (oligonucleòtids que hibridaran en la zona on es vol generar la mutació) tenint en compte els següents criteris:³¹

- mida de l'encebador, entre 25 i 45 bases
- $T_m \geq 78$ °C (T_m , temperatura d'hibridació amb la seqüència d'ADN complementària); vàlid només per mutacions de substitució de bases, com és el nostre cas, no serveix per mutacions que siguin insercions o delecions.

$$T_m = 81,5 + 0,41(\%GC) - \frac{675}{N} - \%Y$$

on %GC és el percentatge de guanines i citosines (ha de ser un número enter), N és la mida de l'encebador en bases, i Y és el % de desparellament, que ha de ser un nombre enter;

- és convenient que la mutació es trobi al centre de la seqüència de l'encebador, amb unes 10 o 15 bases a cada costat
- cal un 40% de composició de GC mínim per garantir un major èxit d'hibridació, i acabar en G ó C per garantir l'estabilitat de l'encebador.

Un cop es tenen els encebadors (taula III.2), es fa una amplificació per PCR amb l'ADN motlle (entre 5-50 ng). Els encebadors, tot i no ser idèntics en un punt concret de la seqüència del gen que es vol mutar, hibriden amb la resta de bases. La polimerasa d'ADN reconeix els extrems 3' dels encebadors i continua polimeritzant a partir d'aquests extrems. Si el temps d'elongació és prou llarg, la polimerasa pot sintetitzar *de novo* tota la cadena complementària del plasmidi, de manera que en desnaturalitzar, s'obtenen dues seqüències: una amb la mutació i la salvatge. En el següent cicle de PCR, s'anirà amplificant l'ADN plasmídic formant-se les noves cadenes mutants, fins que els encebadors tindran més afinitat per les noves mutants ja que l'aparellament de bases serà perfecte. D'aquesta manera, s'obté una barreja d'ADN plasmídic amb un alt percentatge del gen mutant respecte al salvatge. En aquest tipus de PCR, s'utilitza la polimerasa d'ADN *Pfu* (provinent de l'arqueobacteri *Pyrococcus furiosus*) o la polimerasa *Pfu Turbo*[®]. Ambdues posseeixen la capacitat de correcció 3'→5' exonucleasa, que a diferència de la *Taq* polimerasa d'ADN, permet una major correcció dels errors de la polimerització. Per contra, són polimerases més lentes que la *Taq* polimerasa, encara que en el cas de la polimerasa *Pfu Turbo* s'ha incrementat aquesta velocitat de síntesis respecte a la polimerasa *Pfu* convencional.

L'últim pas abans de poder transformar la barreja de PCR en cèl·lules per a l'amplificació biològica és la digestió amb l'enzim DpnI. Aquesta endonucleasa digereix les dianes GATC metilades, com són les cadenes d'ADN motlles emprades en la reacció de PCR. Aquesta digestió permet eliminar les cadenes originals, i per tant, només es transformen aquells plàsmids formats de nou en la reacció de PCR de mutagènesi. La taxa de digestió de les cadenes semi-metilades és 60 vegades inferior a la taxa de digestió de les cadenes completament metilades.

Finalment, s'han pogut clonar els 25 gens de les 25 proteïnes mutants patogèniques de la U3S. El següent pas és expressar-les en sistemes bacterians i purificar-les.

IV.2.1.1. Comparativa dels rendiments d'expressió

Per obtenir les 25 proteïnes mutants patogèniques de la U3S escollides com a objectiu d'estudi s'ha emprat el mateix protocol de purificació que per a la proteïna U3S salvatge (veure apartats III.1.3.3. i III.1.4.1.). Només una de les proteïnes recombinants ha resultat en una expressió tan baixa que no ha permès d'obtenir producte purificat, és el cas del mutant P53L. En tots els perfils cromatogràfics, el pic corresponent a les proteïnes d'interès és menor que en el cas de la proteïna salvatge. Per exemple, en observar els perfils cromatogràfics (resultants de la cromatografia d'exclusió molecular emprant una Superdex 75) del mutant G225S i de la U3S salvatge superposats (veure Figura IV.18), s'aprecia una quantitat menor de mostra en el cas del mutant. Per tal d'obtindre mesures quantitatives de la purificació de la proteïna, s'ha emprat el programa PeakFit v4.12 (veure apartat III.1.4.1.1.).

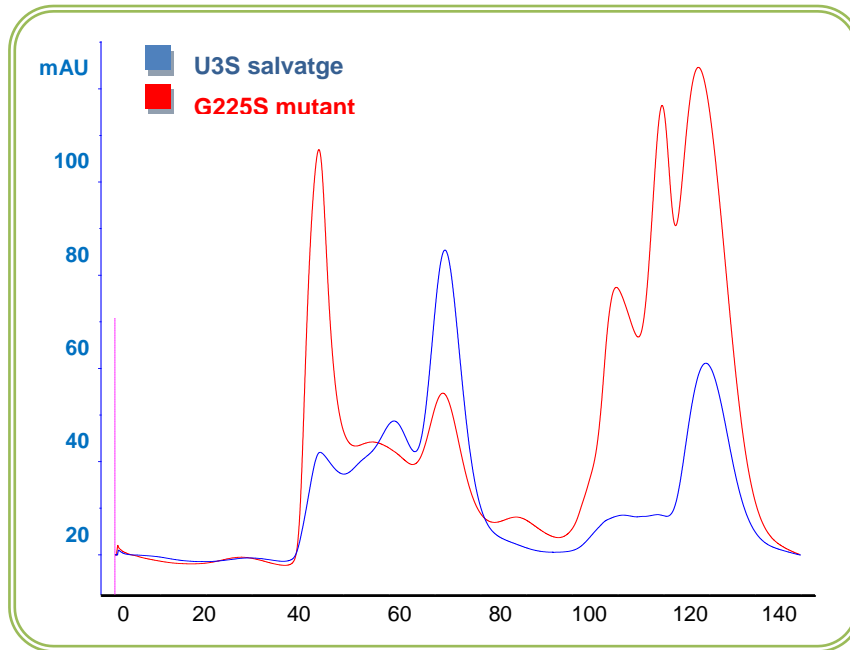
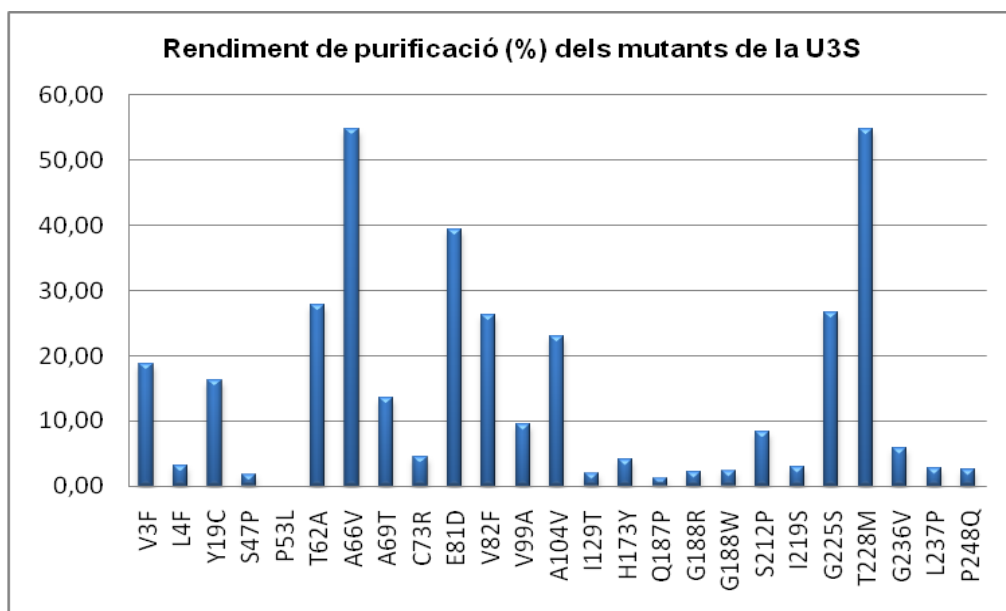


Figura IV.18. Superposició dels perfils cromatogràfics de la U3S salvatge (en blau) i el mutant patogènic G225S (en vermell).

Un cop determinat quin és el rendiment per litre de cultiu que s'obté de la proteïna salvatge U3S (expressada en *E. coli* i en medi LB), s'ha escollit aquest valor com a valor de referència. El valor de rendiment obtingut per a cada una de les proteïnes mutants s'ha determinat respecte a aquest 100% de la proteïna salvatge, i els resultats es representen a la Gràfica IV.1.



Gràfica IV.1. Representació de les dades dels rendiments de purificació de les expressions de les 25 proteïnes mutants de la U3S estudiades en la present tesi.

La primera observació a fer és que totes les proteïnes mutants presenten un menor rendiment d'expressió respecte la proteïna salvatge, la qual cosa apunta cap a una possible menor estabilitat *in vivo* d'aquestes proteïnes mutants, ja sigui per una inestabilitat *per se* del producte d'expressió, o per una major taxa de degradació intracel·lular.

Per altra banda, s'observa un seguit de mutacions amb un rendiment relatiu d'expressió menor del 5%. Es tracta de les mutacions L4F, S47P, C73R, H173Y, Q187P, G188R, G188W, I219S, L237P i P248Q. En la majoria de casos són mutacions trobades (fins a dia d'avui) en pacients de PEC amb fenotips severos o moderats, excepte en el cas de les mutacions S47P i G188W (mutacions trobades en pacients amb fenotips lleus).

En el cas dels mutants amb un rendiment superior al 25% respecte la proteïna salvatge, la majoria es tracta de mutacions associades a fenotips lleus, excepte en casos puntuals on la mutació s'ha trobat en heterozigots en els quals la mutació acompanyant (ja fos deleció, inserció o una altra mutació puntual) ha sigut relacionada amb fenotips moderats o greus. És el cas per exemple de les mutacions G225S i T228M, amb uns rendiments d'expressió relativa del 26.6% i 54.8%, respectivament. Els pacients trobats amb aquestes dues mutacions que tenen un segon al·lel mutant presenten fenotips moderats o greus.^{32, 33} En canvi, quan les dues mutacions apareixen juntes (genotip G225S/T228M) el fenotip de PEC associat és lleu.³²

En general, els rendiments d'expressió trobats en els diversos mutants concorden amb el fenotip dels pacients de PEC, excepte en el cas de les mutacions S47P i G188W, ja que es tracta de mutacions trobades en pacients amb fenotips lleus però en canvi el rendiment d'expressió obtingut respecte a la proteïna salvatge és inferior al 5%. Cal tenir present però, que el fet de trobar baixos nivells d'expressió d'una proteïna recombinant, provinent d'un gen humà i expressada en *E. coli* ja és en sí una alteració de les condicions naturals en les quals es tradueix la U3S, i per tant, tot i tractar-se de dades de les quals se'n desprèn informació, és necessari un estudi més detallat d'aquestes proteïnes mutants per explicar el fenotip dels pacients.

IV.2.2. Caracterització de l'activitat enzimàtica de les proteïnes mutants

L'assaig enzimàtic de cadascuna de les proteïnes mutants s'ha realitzat paral·lelament a una mostra fresca de U3S salvatge com a control. S'han fet un mínim de dues rèpliques per mutants, estimant així l'error experimental.

Comparant els cromatogrames obtinguts de cadascun dels mutants amb el de la proteïna salvatge s'obté un valor relatiu que permet determinar l'activitat enzimàtica dels mutants de la U3S (respecte a la proteïna salvatge en les condicions experimentals). En la Figura IV.19

s'observa la separació dels isòmers I i III, i es comparen els cromatogrames dels mutants amb els de la U3S salvatge per superposició.

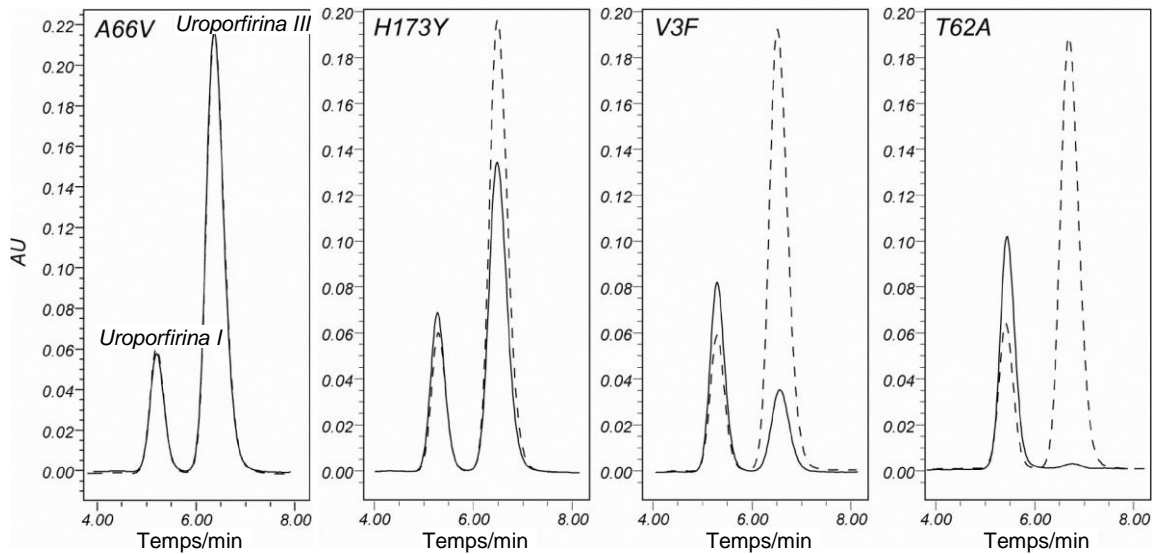


Figura IV.19. Separació mitjançant HPLC dels dos isòmers uroporfirinogen I (temps de retenció 5.3 min) i uroporfirinogen III (temps de retenció 6.5 min) de quatre mutants representatius. Les línies sòlides i puntejades corresponen als cromatogrames dels mutants i de l'enzim salvatge, respectivament.

En la següent taula es recullen els resultats de l'activitat enzimàtica de 24 mutants de la U3S trobats en pacients de porfíria eritropoiètica congènita. Aquests resultats s'obtenen calculant primer la relació entre els isòmers d'uroporfirinogen obinguts en l'assaig enzimàtic de la U3S, i posteriorment comparant-los amb els resultats obtinguts per a cada mutant.

<i>Mutant</i>	<i>rEA / %</i>	<i>Mutant</i>	<i>rEA / %</i>
V3F	13.5 ± 2	I129T	20 ± 4.0
L4F	14.7 ± 0.3	H173Y	24.6 ± 7.2
Y19C	24.0 ± 2.2	Q187P	15 ± 1.9
S47P	99.0 ± 1.1	G188R	71.4 ± 7.6
T62A	17.2 ± 3.9	G188W	84 ± 3.4
A66V	73.2 ± 0.2	S212P	30 ± 7.9
A69T	98.8 ± 1.2	I219S	85 ± 5.0
C73R	20.8 ± 3.1	G225S	35.5 ± 2.5
E81D	100.0 ± 0.1	T228M	97.5 ± 2.5
V82F	100.0 ± 0.1	G236V	34 ± 3.9
V99A	89.2 ± 9.8	L237P	75.5 ± 5.5
A104V	100.0 ± 0.1	P248Q	29.2 ± 3.2

Taula IV.2. Resultats de l'activitat enzimàtica relativa dels 24 mutants de la U3S trobats en pacients amb PEC, respecte als valors d'activitat de l'enzim salvatge.

En general, els valors d'activitat obtinguts emprant les proteïnes recombinants pures són molt més alts que els que havien sigut determinats per altres autors. Els valors d'activitat relativa obtinguts dels mutants oscil·len entre 1.2% i 100% d'activitat relativa, amb un promig de 50.3%. Aquest valor tan elevat concorda amb el caràcter recessiu de la malaltia: un individu amb un sol al·lel mutant pot mantenir entre un 50 i un 100% de l'activitat sintasa. La majoria de les mutacions patogèniques amb una activitat específica relativa menor del 30% estan localitzades en residus proposats com a residus d'interacció amb el substrat, segons els anàlisis prèviament proposats per Desnick i col·laboradors.¹⁰ Aquests residus es troben molt dispersos en la proteïna, recolzant la idea de que el centre catalític de l'enzim possiblement es trobi en la cavitat que es forma entre els dos dominis de la U3S.

El fenotip dels pacients de PEC s'ha classificat en base a una classificació proposada prèviament per Weiming Xu i col·laboradors,³⁴ i es basa en tres grans blocs: els pacients amb erupcions a la pell i anèmia deguda a una activitat residual de la sintasa es consideren fenotips suaus; eritrodòncia, anèmia, deformació cartilaginosa, alopecia, hipertricosis, es considera un fenotip moderat; mentre que es considera un fenotip sever aquell on la vida del pacient corre perill, i la transfusió sanguínia és vital.

Els valors resumits a la Taula IV.2 expliquen la majoria de fenotips associats en pacients amb PEC, com és el cas dels mutants L4F, Y19C, I129T, H173Y, G236V, G225S i S212P, els quals s'associen amb fenotips moderats o severos, ja sigui presentant-se en pacients homozigots o bé tractant-se de mutacions acompanyants d'altres que també s'han associat amb fenotips severos, com és el cas del mutant G236V trobat en un pacient amb PEC amb símptomes severos i amb el genotip G236V/C73R. No és un cas únic: pacients amb el genotip A104V/C73R, o T228M/C73R també presenten un fenotip greu, mentre que quan aquestes mutacions es troben associades amb d'altres mutacions el fenotip es considera suau.

Es dona el cas contrari, on el fenotip associat a una mutació és suau i amb l'assaig enzimàtic s'han obtingut valors raonables d'activitat enzimàtica (més d'un 70% respecte a la U3S salvatge), com és el cas dels mutants S47P, A66V, E81D, G188W, V82F i V99A. En tots aquests casos existeix concordança entre els fenotips i els valors d'activitat enzimàtica.

En altres casos però, el fenotip de la malaltia no sembla ser explicable a partir dels valors d'activitat obtinguts, com és el cas de les proteïnes mutants A69T, G188R, I219S i L237P, on l'activitat supera el 70% però el fenotip associat a la mutació és moderat o fins i tot sever. És en aquest moment en què s'apunta cap a un segon factor responsable de la baixa o nul·la activitat sintasa. Experiments amb la U3S havien demostrat que es tracta d'un enzim poc estable. Per tant, l'enzim podria no ser actiu degut a no estar correctament plegat, per exemple, com a conseqüència de la seva inestabilitat. Així doncs, s'ha decidit ampliar els estudis d'estabilitat de la U3S als seus mutants patogènics.

IV.2.3. Caracterització per RMN

Una de les primeres qüestions a resoldre és si l'activitat parcial dels enzims mutants és resultat d'un canvi estructural de les proteïnes. Amb aquesta finalitat, s'ha comparat el patró de dispersió dels senyals de desplaçament químic dels experiments HSQC dels diversos mutants respecte a l'espectre de la proteïna salvatge, utilitzant per aquesta finalitat les proteïnes mutants expressades en medi mínim isotòpicament marcat (^{15}N) i un espectròmetre Bruker de 800 MHz.

En tots els casos es tracta de proteïnes estructurades, tal com confirmen els seus espectres HSQC: els diagrames de contorns corresponents a la correlació dels desplaçaments químics de protó i nitrogen estan ben definits, i el fet que aquests desplaçaments es trobin en diferents zones de l'espectre implica que els protons amides que conté la proteïna tenen un entorn químic diferent entre ells, i per tant, existeix un plegament que provoca aquests canvis electrònics.

En segon lloc, les diferents proteïnes mutants es poden classificar segons si el patró de dispersió dels senyals dels HSQC respectius difereixen molt o no de l'espectre HSQC de la U3S salvatge. En general, aquest patró de dispersió dels mutants s'assembla a l'obtingut amb la proteïna U3S salvatge tal i com es pot observar en la Figura IV.19, on s'hi representa la superposició dels espectres obtinguts per a tres mutants, el patró de dispersió dels desplaçaments químics dels quals no varia de manera considerable respecte a la proteïna salvatge (veure Figura IV.9).

Existeix, però, un grup de mutants que presenten un espectre molt diferent del de la proteïna U3S salvatge: es tracta del mutant C73R, el G236V i el L237P, tal i com es mostra en la Figura IV.21 i en tots tres casos, la mutació està associada a fenotips severos de PEC (referències a la Taula I.1).

Observant els espectres HSQC dels mutants i de la proteïna salvatge es pot afirmar que existeixen com a mínim 3 mutacions que provoquen un canvi conformacional de la proteïna, donant lloc a un patró de dispersió de senyals de desplaçaments químics molt diferent al de l'enzim salvatge (veure Figura IV.21). Com ja s'ha comentat, en tots tres casos es tracta de proteïnes associades a fenotips severos, i aquest canvi conformacional en podria ser l'explicació. En el cas de la resta de mutants que mantenen una estructura i un patró de dispersió dels desplaçaments químics similars als de la proteïna U3S salvatge, l'explicació de la seva patogenicitat caldrà buscar-se en un origen diferent a l'estructural.

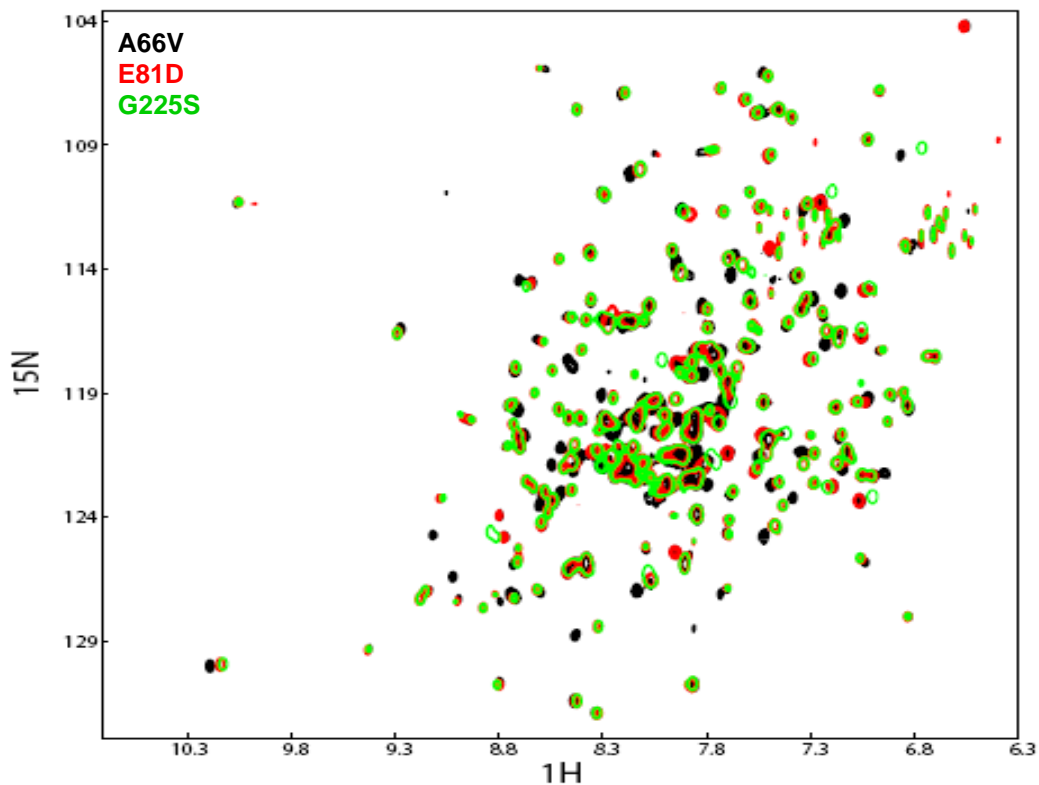


Figura IV.20. Superposició dels espectres HSQC de les proteïnes mutants A66V (senyals representades en negre), E81D (senyals dels desplaçaments químics representats en vermell) i G225S (senyals dels desplaçaments químics representats en verd).

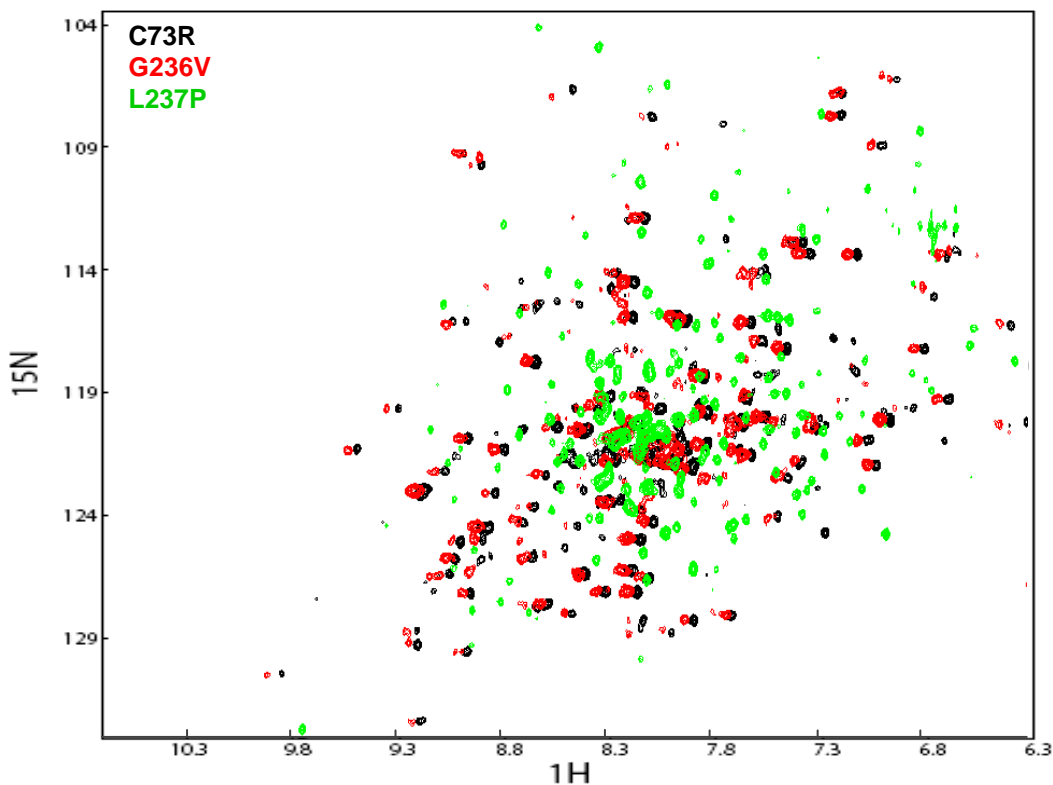


Figura IV.21. Superposició dels espectres HSQC dels mutants C73R (negre), G236V (vermell) i L237P (verd).

IV.2.4. Determinació de l'estabilitat cinètica de les proteïnes mutants

Amb l'objectiu d'avaluar l'impacte en l'estabilitat de la U3S de les mutacions puntuals associades a casos PEC, s'ha determinat les constants de velocitat de desplegament per a les proteïnes mutants dins el rang entre 34-52 °C (amb un mínim de 4 temperatures per cada mutant). Els temps de vida mitja a 37 °C s'ha vist que van des de 0.16 h a 339 h, i s'han calculat les velocitats de desplegament respecte a la proteïna salvatge, com es pot observar en la Figura IV.23A.

S'han obtingut les relacions linears entre el $\ln(k_{NU})$ respecte $1/T$ per tots els mutants (es mostren dos exemples representatius a la Figura IV.23) permetent així una estimació de les barreres energètiques d'activació per a tots els mutants (o E_a), tal i com es resumeix a la Taula IV.3, i es mostra a la Figura IV.23B.

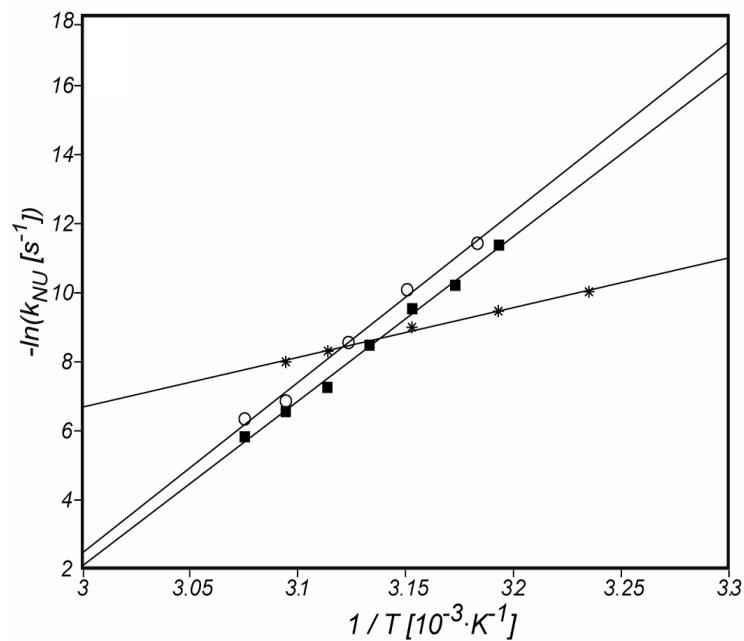


Figura IV.22. Representació d'Arrhenius de les transicions de desplegament de la proteïna U3S mesurat per diroisme circular. Els quadrats negres representen els valors de l'enzim U3S salvatge, mentre que els cercles blancs i els asteriscs corresponen als mutants S47P i A66V, respectivament. Les línies representen la regressió lineal de les dades, que s'ha utilitzat per obtenir l'energia lliure (E_a , recollits a la Taula IV.3).

Així com la majoria de mutacions semblen provocar només petites perturbacions en la barrera d'activació energètica, un grup de mutacions provoquen una disminució en la barrera d'energia de desplegament de com a mínim un factor de 2.

Mutant	$k_{UN}(Mut)/k_{UN}(WT)$	$E_a^*/\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$	Mutant	$k_{UN}(Mut)/k_{UN}(WT)$	$E_a^*/\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$
V3F	0.25 ± 0.02	113.0 ± 9.2	I129T	0.77 ± 0.01	67.8 ± 1.4
L4F	0.18 ± 0.02	100.3 ± 6.0	H173Y	2.42 ± 0.04	33.0 ± 0.9
Y19C	2.05 ± 0.16	63.4 ± 8.2	Q187P	1.22 ± 0.03	71.1 ± 2.5
S47P	0.71 ± 0.02	96.0 ± 4.3	G188R	0.99 ± 0.06	78.9 ± 7.8
T62A	30.49 ± 0.31	27.7 ± 0.8	G188W	1.2 ± 0.04	78.7 ± 3.2
A66V	39.21 ± 0.80	32.0 ± 2.6	S212P	47.1 ± 1.13	33.6 ± 2.4
A69T	29.29 ± 2.05	42.1 ± 6.8	I219S	5.22 ± 0.06	40.0 ± 1.1
C73R	380.9 ± 30.0	22.0 ± 9.5	G225S	1.68 ± 0.07	92.0 ± 4.8
E81D	2.38 ± 0.09	87.0 ± 4.4	T228M	10.13 ± 0.30	95.7 ± 3.4
V82F	4.73 ± 0.05	87.0 ± 0.6	G236V	2.01 ± 0.08	44.2 ± 1.8
V99A	1.19 ± 0.07	103.4 ± 6.0	L237P	7.58 ± 0.68	46.7 ± 9.0
A104V	6.82 ± 0.13	91.5 ± 2.3	P248Q	0.67 ± 0.03	86.2 ± 5.5

Taula IV.3. Dades dels valors d'estabilitat dels mutants de la U3S relacionats amb casos de PEC. *El valor d' E_a de la U3S salvatge és de $101.5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. L'estimació dels errors s'ha fet a partir de l'ajust lineal de les velocitats cinètiques respecte la temperatura.

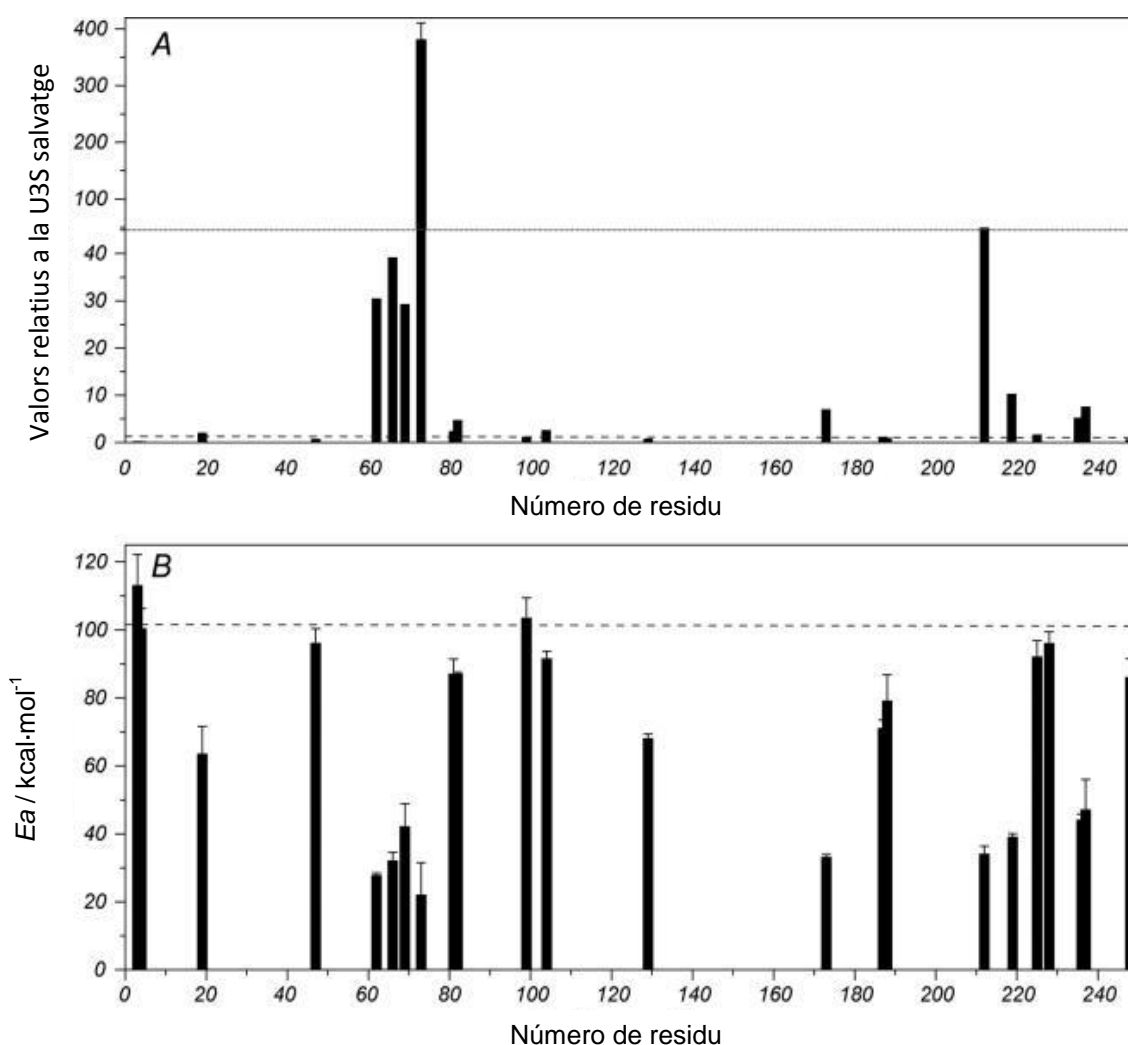


Figura IV.23. A) Factor d'augment $[k_{NU}(Mut)/k_{NU}(WT)]$ calculat a 37 °C per cadascun dels mutants. S'ha variat l'escala al llarg de l'eix d'ordenades, indicat per la línia discontinua al centre a la gràfica. B) Representació de l'energia d'activació (E_a) en funció del número de residu aminoacídic. El valor per a la proteïna U3S salvatge s'ha representat amb una línia discontinua.

La proteïna U3S pateix una desnaturalització irreversible amb el temps en mostres pures. S'ha demostrat que la conformació plegada no és estable a temperatura fisiològica i dona lloc a un desplegament espontani seguit d'un procés d'agregació. El desplegament de l'enzim s'accentua en un seguit de mutants que retenen la major part de la seva activitat sintasa (aquests són A69T, I219S i L237P), la qual cosa explicaria el fenotip de PEC dels portadors d'aquestes mutacions. Comparant les barreres d'energia d'activació de desplegament dels diferents mutants assajats s'ha pogut identificar dues regions de la proteïna on les mutacions causen un increment important en la velocitat de desplegament.

IV.2.4.1. La tercera hèlix de la U3S, un punt clau en l'estabilitat de l'enzim

Tal i com es resumeix en la Taula IV.3, el desplegament proteic es veu dràsticament accelerat en un seguit de mutants, que poden agrupar-se en dos regions principals d'alta inestabilitat: els residus 212 i 219 de la zona C-terminal, i especialment els residus trobats en pacients amb símptomes severes de PEC, els mutants T62A, A66V, A69T i C73R. Aquests darrers es troben localitzats en la mateixa cara de la tercera hèlix alfa, connectats entre ells per enllaços d'hidrogen, tal i com s'aprecia a la Figura IV.24, on s'ha representat mitjançant el programa Molmol³⁵ l'estructura de la U3S humana publicada per Mathews i col·laboradors l'any 2001. En aquesta figura, les cadenes laterals dels residus estudiats al llarg de la present tesis estan representats amb un model CPK, i a partir de la llegenda s'observa per colorimetria els diversos valors d'*E_a* obtinguts per cadascun dels mutants analitzats, representats en vermell aquells amb una menor energia d'activació.

La mutació C73R és la mutació més estesa, trobada en un terç dels pacients amb PEC, i una de les associades amb fenotips més severes.³⁶ A més, es tracta d'una mutació pan-ètnica, no originària d'un mateix antecessor.³⁷ L'anàlisi cinètic del desplegament dels diversos mutants ha revelat que la mutació C73R és la més desestabilitzant de les estudiades, amb el valor *E_a* més baix, donant lloc a una velocitat de desplegament 380 vegades més ràpida que la velocitat de la U3S salvatge, la qual cosa explicaria per si sola la baixa activitat U3S trobada en els pacients portadors d'aquesta mutació.

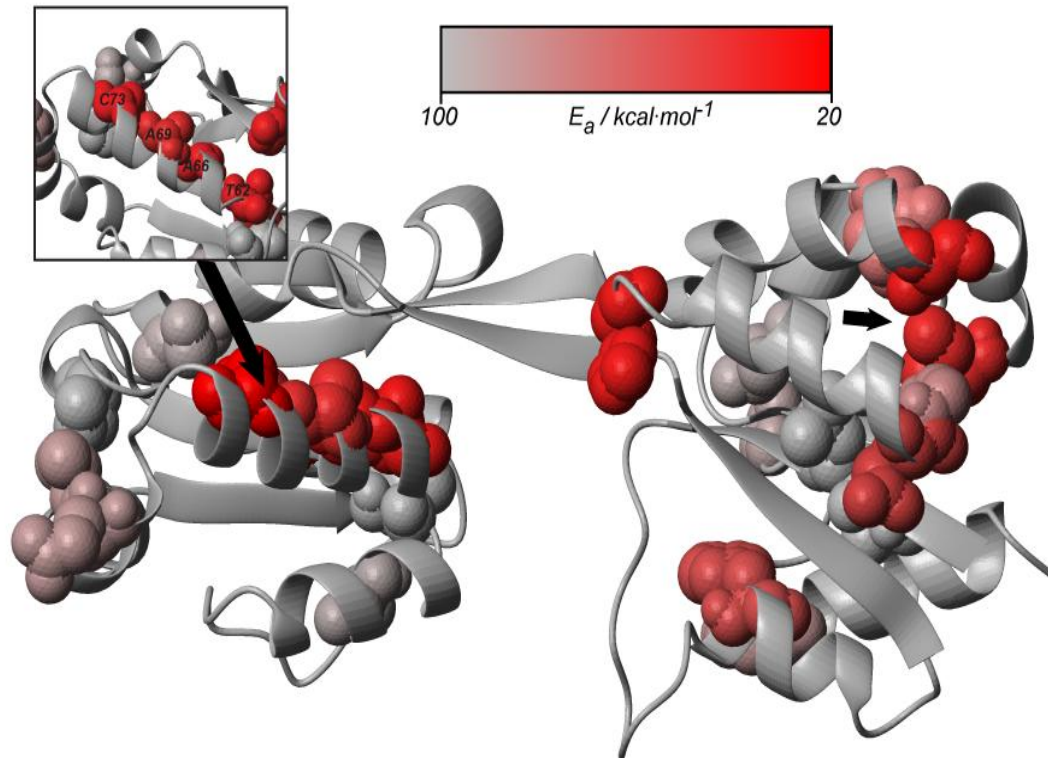


Figura IV.24. Representació en cinta de la proteïna U3S salvatge humana (PDB codi 1jr2)³⁸ mitjançant el programa Molmol. Els residus estudiats al llarg de la present tesi s'han representat amb el format CPK. Les fletxes assenyalen les regions de la proteïna més desestabilitzades segons aquestes mutacions. S'observa una ampliació de la tercera hèlix del domini N-terminal de la U3S.

Com a prova de principis, podria ser interessant establir la tercera hèlix en proteïnes patogèniques que hi contenen una mutació, i més concretament en el cas del mutant C73R. En aquesta direcció i enfocat en el món de la teràpia gènica, s'han dissenyat un seguit de dobles mutants amb l'objectiu d'aconseguir una millora en l'estabilitat de les proteïnes mutants, i en última instància, un augment de l'activitat enzimàtica en els pacients. Observant la tercera hèlix s'observa com la disposició dels residus no afavoreix el moment dipolar de la mateixa (veure la Figura IV.25). L'aproximació proposada en la direcció de la millora de l'estabilització del mutant C73R ha consistit en millorar les càrregues globals de l'hèlix. Amb aquesta finalitat s'han generat proteïnes doblement mutants; per una banda la mutació d'interès C73R, juntament amb alguna de les següents mutacions:

- E71Q: l'objectiu és eliminar el residu glutàmic 71, substituint-lo per una glutamina, amb la finalitat d'eliminar la càrrega negativa que podria estar desestabilitzant l'hèlix alfa.
- E71K: substitució del residu glutàmic 71 per un residu de lisina, amb l'objectiu d'eliminar una càrrega negativa i aportar-ne una de positiva, per afavorir la interacció amb el residu E68 en l'estructura terciària.

- E75Q: substitució de la càrrega negativa del residu glutàmic 75 per una glutamina, és a dir, eliminar el punt de desestabilització que aporta el glutàmic al moment dipolar de l'hèlix.

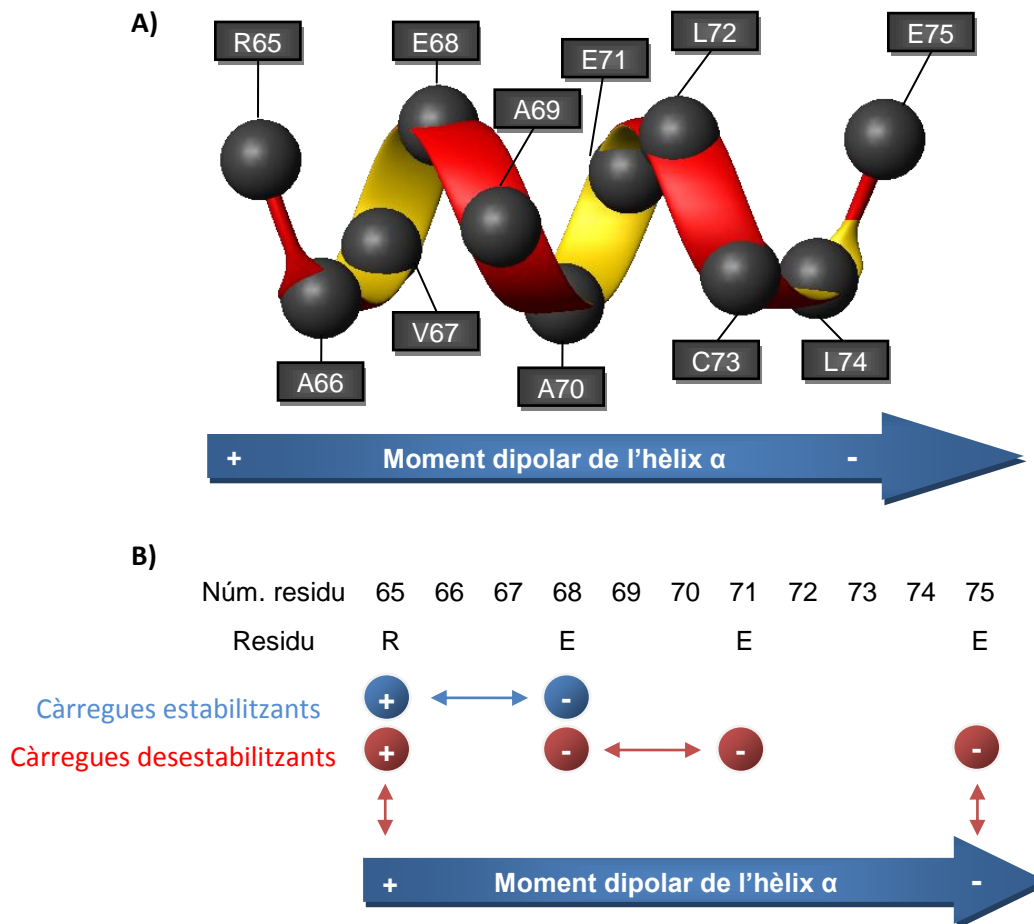


Figura IV.25. A) Representació de la tercera hèlix alfa de la U3S mitjançant el programa Molmol. L'enllaç peptídic s'ha representat en el format *ribbon* mentre que els residus (etiquetats en la figura) s'han representat en el format CPK. La fletxa representa el dipol que es genera en l'hèlix alfa, amb la càrrega global positiva a l'extrem N-terminal i la negativa a l'extrem C-terminal. **B)** factors que estabilitzen i desestabilitzen el moment dipolar de l'hèlix alfa. Cada quatre residus l'hèlix fa un gir complet, i per tant les cadenes laterals dels aminoàcids que es troben a quatre residus de distància poden interaccionar entre elles.

Un cop dissenyats, clonats, expressats i purificats aquests dobles mutants, els experiments mostren que els enzims doblement mutants són menys actius que la proteïna U3S salvatge, com s'observa en els valors d'activitat enzimàtica recollits en la següent taula:

Mutant	rEA / %
C73R/E71Q	25
C73R/E71K	31
C73R/E75Q	24

Taula IV.4. Valors d'activitat enzimàtica obtinguts per als tres dobles mutants de la proteïna U3S dissenyats.

Aquest experiment de disseny de noves proteïnes tenia la finalitat de trobar dobles mutants que revertissin els efectes de la mutació C73R, estabilitzant la tercera hèlix alfa de la proteïna, però tot i demostrar de que es tracta d'una zona d'alta inestabilitat, l'estratègia seguida no ha proporcionat una millora en l'activitat sintasa. En aquest sentit, seria interessant la cerca de compostos químics que permetessin estabilitzar aquesta hèlix sense recórrer a l'enginyeria de proteïnes, encaminant aquesta cerca cap a un futur disseny de fàrmacs per a aquest terç de pacients de PEC portadors d'aquesta mutació C73R.

IV.2.5. Anàlisi conjunt de l'activitat i l'estabilitat *in vitro* en el context de la PEC

Tal i com s'ha comentat en l'apartat III.4., la proteïna U3S pateix un procés de desnaturalització que provoca una evolució de l'enzim cap a un estat desplegat i irreversible. S'ha vist com, en incubar una mostra d'U3S a 37°C, els valors d'el·lipticitat decreixien amb el temps degut a aquest desplegament espontani (cercles blancs en la Figura IV.26). Aquest procés ha d'estar acompanyat d'una pèrdua de la funció biològica, i de fet el valor de rEA (activitat enzimàtica relativa) de l'enzim U3S salvatge incubat a 37°C també decau amb el temps i a la mateixa velocitat que el senyal de dicromisme circular, o DC (cercles negres a la Figura IV.26).

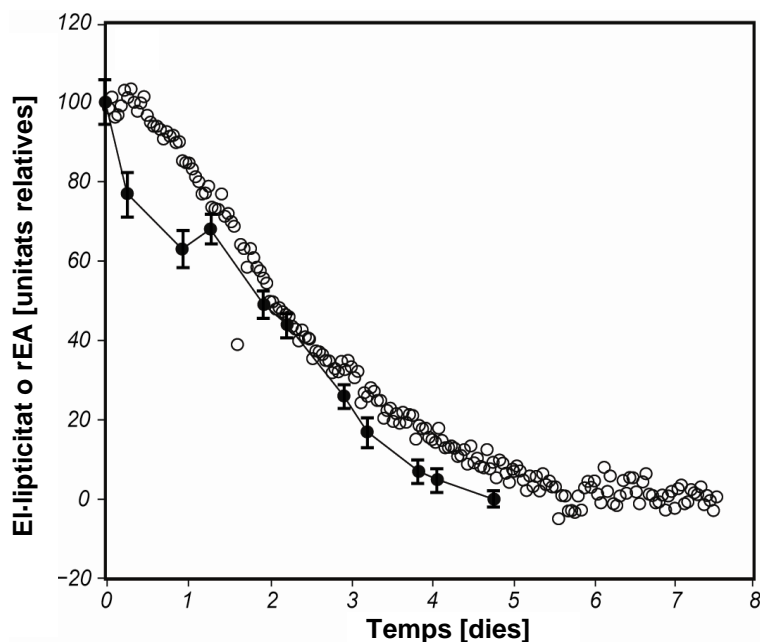


Figura IV.26. Representació del decaïment de l'el·lipticitat (cercles blancs) en funció del temps i de l'activitat enzimàtica (rEA, cercles negres) a temperatura fisiològica en una mostra de U3S salvatge (5 μ M).

En la Taula IV.5 es recullen els resultats conjunts de l'activitat enzimàtica i l'estabilitat cinètica dels mutants patogènics responsables de porfíria estudiats en la present tesi.

Mutant	Purification Yield / %	rEA / %	$k_{UN}(\text{Mut})/k_{UN}(\text{WT})$	E_a / kcal·mol ⁻¹
V3F	18.7	13.5 ± 2	0.25 ± 0.02	113.0 ± 9.2
L4F	3.2	14.7 ± 0.3	0.18 ± 0.02	100.3 ± 6.0
Y19C	16.2	24.0 ± 2.2	2.05 ± 0.16	63.4 ± 8.2
S47P	1.7	99.0 ± 1.1	0.71 ± 0.02	96.0 ± 4.3
P53L	0.0	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>
T62A	27.7	17.2 ± 3.9	30.49 ± 0.31	27.7 ± 0.8
A66V	54.8	73.2 ± 0.2	39.21 ± 0.80	32.0 ± 2.6
A69T	13.6	98.8 ± 1.2	29.29 ± 2.05	42.1 ± 6.8
C73R	4.4	20.8 ± 3.1	380.9 ± 30.0	22.0 ± 9.5
E81D	39.4	100.0 ± 0.1	2.38 ± 0.09	87.0 ± 4.4
V82F	26.3	100.0 ± 0.1	4.73 ± 0.05	87.0 ± 0.6
V99A	9.4	89.2 ± 9.8	1.19 ± 0.07	103.4 ± 6.0
A104V	23	100.0 ± 0.1	6.82 ± 0.13	91.5 ± 2.3
I129T	1.9	20 ± 4.0	0.77 ± 0.01	67.8 ± 1.4
H173Y	4	24.6 ± 7.2	2.42 ± 0.04	33.0 ± 0.9
Q187P	1.2	15 ± 1.9	1.22 ± 0.03	71.1 ± 2.5
G188R	2.2	71.4 ± 7.6	0.99 ± 0.06	78.9 ± 7.8
G188W	2.3	84 ± 3.4	1.2 ± 0.04	78.7 ± 3.2
S212P	8.3	30 ± 7.9	47.1 ± 1.13	33.6 ± 2.4
I219S	3	85 ± 5.0	5.22 ± 0.06	40.0 ± 1.1
G225S	26.6	35.5 ± 2.5	1.68 ± 0.07	92.0 ± 4.8
T228M	54.8	97.5 ± 2.5	10.13 ± 0.30	95.7 ± 3.4
G236V	5.8	34 ± 3.9	2.01 ± 0.08	44.2 ± 1.8
L237P	2.8	75.5 ± 5.5	7.58 ± 0.68	46.7 ± 9.0
P248Q	2.5	29.2 ± 3.2	0.67 ± 0.03	86.2 ± 5.5

Taula IV.5. Resum de la caracterització dels 25 mutants patogènics descrits de la U3S.

En el cas dels mutants G236V, C73R i L37P, se n'ha obtingut un patró estructural que difereix de l'enzim salvatge (veure apartat IV.1.4.3.). Els resultats observats en aquest grup de mutants corresponen a mutants associats a fenotips severos, que donen un rendiment d'expressió baix (<6%), un valor d'energia d'activació inferior de 50 kcal·mol⁻¹ (en el cas del mutant C73R el valor d' E_a és inclús menor: 22.0 ± 9.5 kcal·mol⁻¹) i en el cas dels mutants C73R i G236V, s'han obtingut uns valors d'activitat enzimàtica del 20.8% i 34%, respectivament. Mentre que l'activitat enzimàtica i el rendiment d'aquests mutants *per se* ja podrien explicar els fenotips severos, en el cas del mutant L237P l'explicació pot ser una mica més complexa. En aquest cas, difereix en els altres dos mutants en que l'activitat enzimàtica s'ha vist que és del 75.5(± 5.5)%. Basant-nos ens els resultats obtinguts mitjançant la RMN (veure apartat IV.1.4.3.), possiblement es tracti d'un mutant l'estructura estable però que pateix un canvi conformacional respecte a la forma nativa de l'enzim. És a dir, es podria pensar que mentre

que en els primers minuts des que s'obté l'enzim mutant de l'FPLC, es concentra, es porta a terme l'assaig enzimàtic, fins que aquest finalitza, la proteïna L237P evolucionaria cap a un estat cinèticament més estable, que tindria un temps de vida determinat, però suficientment estable per poder dur a terme un experiment HSQC, i que aquest mostrés senyals suficientment definides. Dels espectres obtinguts dels mutants G236V, C73R i L37P, aquest últim és el que presenta una pitjor relació senyal soroll, la qual cosa aniria en la direcció de la hipòtesi plantejada.

Observant els resultats obtinguts d'activitat enzimàtica i estabilitat cinètica, és possible agrupar els diversos mutants patogènics en quatre grups principals en base a les estabilitats i activitats relatives a la proteïna U3S salvatge (veure Figura IV.27). En el Grup I s'hi troben aquelles mutacions que afecten de manera discreta l'estabilitat i l'activitat sintasa. S'hi troben els residus S47, E81, V82, V99, A104, G188, T228. El mutant S47P s'ha trobat en pacients homozigots per a la mutació, però els fenotips varien molt entre ells, des d'un fenotip sever a un fenotip suau, passant per un fenotip de CEP moderat. En el cas de la resta de residus s'han trobat les mutacions V82F, A104V, G188W i T228M, totes elles en genotips heterozigots, la severitat dels quals depèn de la mutació acompanyant. En el cas de la mutació G188R trobada en un pacient homozigot per aquesta mutació, el fenotip és moderat, amb dependència de transfusió.³⁹ En aquest cas, l'enzim mutant G188R és el que té un rendiment de purificació, una activitat enzimàtica, i una estabilitat relativa menors de tot el grup.

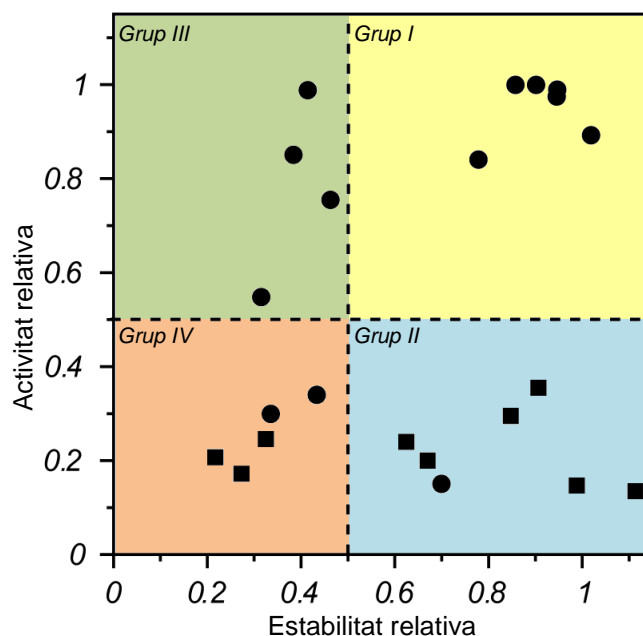


Figura IV.27. Representació dels valors d'activitat relativa obtinguts [rEA(Mut)/rEA(salvatge)] respecte als valors de l'estabilitat relativa [$Ea(\text{Mut})/Ea(\text{salvatge})$] per als 24 mutants estudiats en la present tesi. Per a cada magnitud s'ha considerat un valor de 0,5 per definir els límits de cada grup. Els quadrats representen els residus que pateixen una pertorbació dels seus desplaçaments químics en presència d'un inhibidor, segons Cunha i col·laboradors.

En el Grup III s'hi recullen les mutacions patogèniques amb valors d'activitat elevats però que presenten poca estabilitat. Hi trobem les mutacions A66V, A69T, I219S i L237P, totes elles trobades en pacients de PEC amb fenotips des de moderats a severos, la qual cosa s'explicaria per la baixa estabilitat que presenten.

Per altra banda, en els Grups II i IV s'hi troben aquelles mutacions que afecten l'activitat de la U3S, provocant un descens de més del 50% d'aquesta. En el cas del Grup II, s'hi troben proteïnes amb elevats valors d'estabilitat, però on la seva activitat es veu afectada per la mutació puntual. Dins d'aquest grup s'hi troben els mutants V3F, L4F, I1239T, Q187P, G225S, P248Q i Y19C, tot i que l'estabilitat d'aquest últim és la més baixa dins del grup. En el Grup IV s'hi troben aquelles mutacions relacionades amb fenotips de PEC més severos, ja que les proteïnes mutants resultants tenen disminuïdes tant l'activitat U3S com l'estabilitat cinètica. En la Figura IV.27, es pot observar que algunes mutacions dels Grups II i IV estan marcats com a quadrats enlloc de rodones. Aquests residus són els que Cunha, Desnick i altres col·laboradors havien vist que patien una pertorbació en el seu desplaçament químic en presència d'un inhibidor de l'activitat sintasa. Comparant aquests resultats amb els obtinguts en el present estudi, sembla que aquests residus podrien ser responsables directes de l'activitat catalítica de la U3S.

Finalment, s'han recollit els paràmetres d'activitat i estabilitat relativa dels diferents mutants patogènics estudiats en la present tesi, i aquests valors s'han relacionat amb els fenotips trobats a la literatura, obtenint la següent figura:

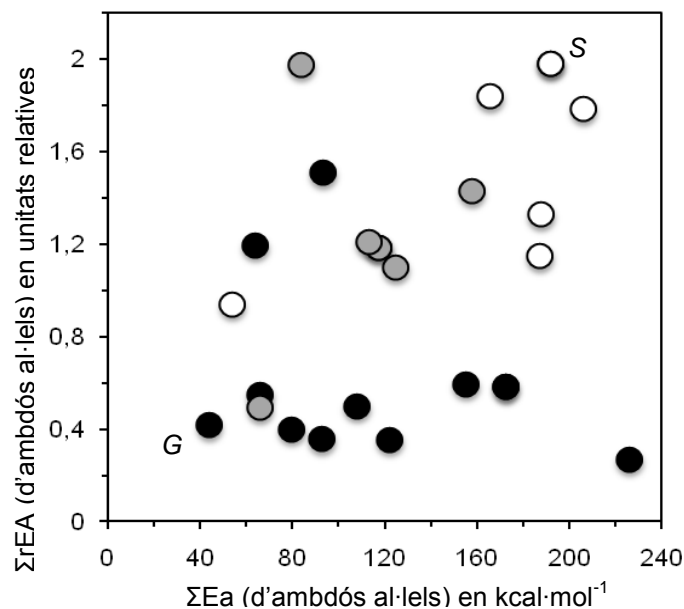


Figura IV.28. Correlació de l'estabilitat i l'activitat del parell d'al·lels que conformen el genotip de pacients de PEC. Els valors de cada eix corresponen al sumatori dels valors de cada mutant, extrets de la Taula IV.5. La severitat del fenotip ve indicada pel color dels cercles: fenotip suau (blanc), moderat (gris) o sever (negre). Les combinacions de mutacions que donen un fenotip greu o pacients sans es troben etiquetats com a G i S, respectivament.

Com era d'esperar, s'observa que aquells genotips que donen lloc a proteïnes menys estables i amb menor activitat estan relacionades amb fenotips més greus (cercles negres en la Figura IV.28), i en general, els genotips mutants trobats en pacients amb simptomatologia lleu de PEC corresponen a parells d'al·lels que tenen valors elevats d'activitat i d'estabilitat. De totes maneres, en aquesta correlació fenotip-genotip cal tenir present que està basada en fenotips descrits per diversos autors, a part de que els pacients estan sotmesos a diferents factors ambientals, i per tant, és només una aproximació que permet recolzar la hipòtesi de treball defensada en la present tesi, que apunta l'estabilitat cinètica i l'activitat enzimàtica com a factors principals de la pèrdua d'activitat U3S en els pacients de PEC.

IV.3. ESTUDIS *IN VIVO* DELS ENZIMS HUMANS U3S SALVATGE I DEL MUTANT PATOGENÈIC U3S-C73R

Un dels objectius finals dels estudis *in vitro* de l'estabilitat de la U3S salvatge i dels mutants patogènics es entendre quin és l'origen de la porfíria eritropoiètica congènita (PEC). Així doncs, i un cop determinat quin és l'impacte en l'estabilitat cinètica i l'activitat enzimàtica que introdueix la mutació *in vitro*, és convenient d'explorar els canvis que produeixen les mutacions *in vivo*.

S'ha escollit al mutant U3S-C73R, present en un terç dels malalts de PEC,⁴⁰ per estudiar el seu comportament *in vivo*. En el tub d'assaig la proteïna U3S-C73R és molt poc estable a temperatura fisiològica encara que es desconeix què succeeix en l'entorn cel·lular. S'han dissenyat clonacions de cultius cel·lulars eucariotes en el quals s'expressin les proteïnes U3S salvatge i el mutant U3S-C73R per poder comparar-ne l'expressió total. L'observació d'aquesta expressió s'ha determinat per diferent mètodes: proteïna total expressada en cultiu (mitjançant tècniques d'immunotransferència de proteïnes o western), quantificació de l'expressió cel·lular i finalment s'ha determinat la localització de la proteïna en la cèl·lula (a través de tècniques de microscòpia òptica fluorescent)

IV.3.1. Disseny de les construccions

IV.3.1.1. L'enzim U3S sense proteïnes de fusió

Per als experiments de localització cel·lular s'han generat les construccions 054wt i 0534C73R (veure la taula III.5), que un cop clonats dins les cèl·lules hoste donaran lloc a les proteïnes U3S salvatge i U3S-C73R. Els resultats de la digestió del vector p054 amb els enzims NotI i EcoRI es mostren a la Figura IV.29, així com els resultats de les amplificacions per PCR dels gens de la U3S salvatge i del mutant U3S-C73R. Els fragments presenten la mida esperada en tots els casos.

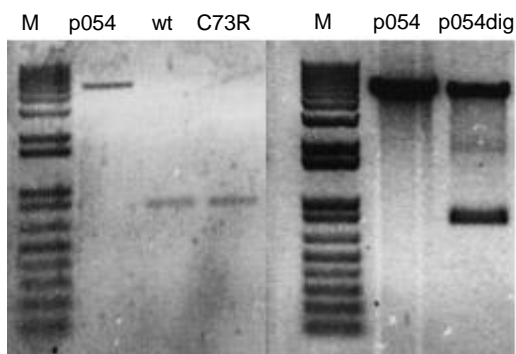


Figura IV.29. Gels d'agarosa de l'experiment d'amplificació de fragments. Esquerra: vector p054 sense digerir (carril "p054"), i gens amplificats per PCR de la U3S salvatge (carril "wt") i del mutant U3S-C73 (carril "C73R"). Dreta: vector p054 sense digerir (carril "p054") i digerit amb els enzims NotI i EcoRI (carril "p054dig"). Els marcadors de pes molecular corresponen als marcadors d'1 kb de la Figura IV.30.

IV.3.1.2. L'enzim U3S amb la proteïna de fusió *myc*

Les construccions utilitzades pels experiments d'expressió gènica (IV.3.2.) són les següents: 289wt, 289C73R, 437wt, 437C73R (detalls a la taula III.5). Breument, els dos vectors proporcionen una cua o seqüència diana *myc* unida a la proteïna U3S. El fragment *myc* (la seqüència d'aminoàcids del qual és N- EQKLISEEDL -C) permet la localització tant a nivell cel·lular com a nivell d'extracte proteic degut a que s'uneix específicament a un anticòs.

Els gens que codifiquen per la U3S salvatge i per la proteïna mutant U3S-C73R provenen dels plasmidis referits a l'apartat III.1., els quals s'han amplificat mitjançant una reacció de PCR (apartat III.6.2.1.) i digerit amb els enzims EcoRI i Sall per poder lligar-los dins dels vectors p289 i p437 prèviament digerits. El resultat de les digestions es poden observar a la Figura IV.30. Els resultats de la PCR amb els encebadors 228 i 229 no es mostren.

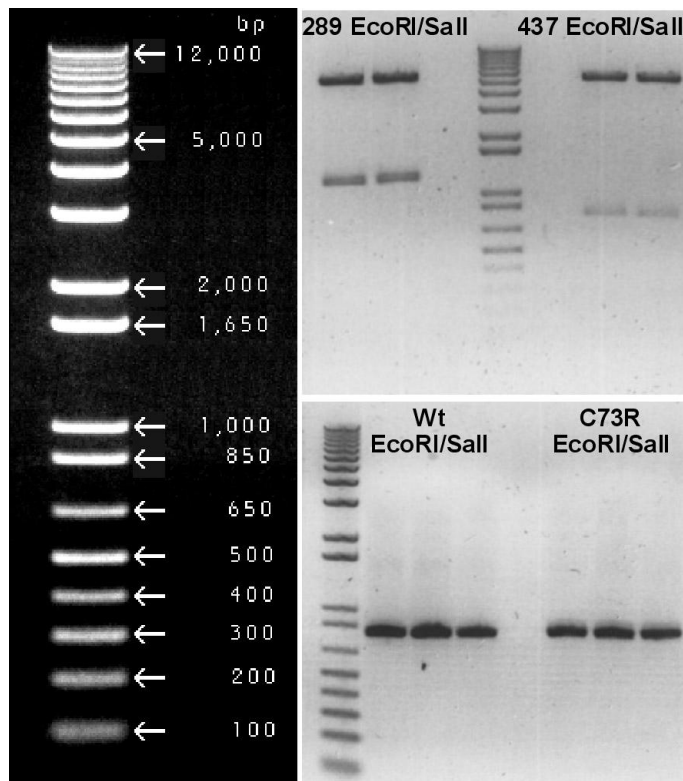


Figura IV.30. Part esquerra: marcadors de pes molecular d'1 kb Invitrogen. Part superior dreta: digestió dels vectors p289 i p437, amb els enzims EcoRI i Sall, resultats en gels d'agarosa a l'1%. La digestió amb EcoRI/Sall del vector p289 produeix una banda de 1100 pb mentre que per el vector p437, el fragment esperat és de 800 pb. Part inferior dreta: gens amplificats de la proteïna U3S salvatge (Wt a la figura) i del mutant U3S-C73R (C73R a la figura) amb els encebadors 228 i 230 (taula III.3). En ambdós casos la mida esperada és de 860 pb.

IV.3.1.3. L'enzim U3S amb la proteïna de fusió EGFP

Pels experiments de localització cel·lular s'han emprat les construccions 553wt (EGFP-U3Swt), 553C73R (EGFP-U3S-C73R), 607wt (U3Swt-EGFP) i 607C73R (U3S-C73R-EGFP), detallats a l'apartat III.6.2.1. Aquestes construccions generen per un producte proteic format per la proteïna U3S (la salvatge o el mutant U3S-C73R) unida a una variant de la proteïna GFP, la

EGFP, de 264 residus. Aquesta proteïna de fusió dotarà de fluorescència al complex, permetent-ne la seva localització cel·lular per fluorescència directa.

Els gens que codifiquen per a les proteïnes U3S salvatge i pel mutant U3S-C73R provenen dels plasmidis detallats a l'apartat III.1., els quals s'han amplificat mitjançant una reacció de PCR (apartat III.6.2.1.) i s'han digerit amb els enzims EcoRI i Sall per poder lligar-los dins dels vectors p553 i p607 prèviament digerits amb els mateixos enzims de restricció. El resultat de les digestions dels vectors es poden observar a la Figura IV.31.

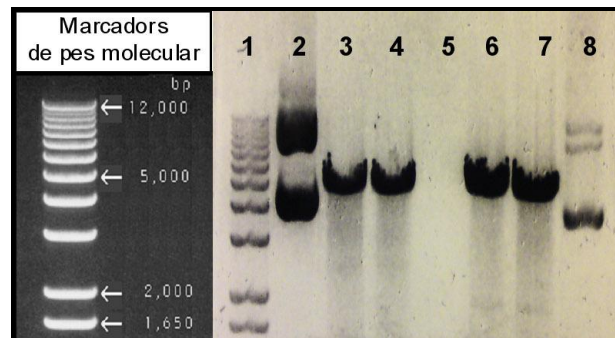


Figura IV.31. Resultats de la digestió dels plasmidis p553 i p607 amb els enzims EcoRI/Sall. Carril 1: marcadors de pes molecular. Carrils 2 i 8: controls (sense digerir) dels vectors p553 i p607 respectivament. Carrils 3 i 4: vector p553 digerit amb EcoRI/Sall. Carrils 6 i 7: vector p607 digerit amb EcoRI/Sall.

IV.3.2. Efectes de la mutació C73R en l'expressió de la U3S en eucariotes

IV.3.2.1. Comparació del nivell de transcripció del gen salvatge i del gen C73R

La caracterització *in vitro* d'una proteïna pot distar molt del comportament d'aquesta en l'entorn cel·lular. Degut a que els enzims recombinants U3S i els seus mutants que s'estudien en la present tesi són d'origen humà obtinguts a través d'un sistema bacterià, és interessant establir si aquestes proteïnes recombinants també s'expressen en cèl·lules eucariotes, com són les cèl·lules de mamífer, i en quin grau. Tanmateix, s'ha clonat la línia cel·lular humana M1 (apartat III.6.1.1.) amb les construccions que es detallen a l'apartat IV.6.2.1., per tal de determinar els nivells d'expressió de la proteïna salvatge U3S i d'un dels mutant patogènics trobats amb més freqüència en pacients de PEC, el mutant U3S-C73R.

Per determinar l'expressió gènica dels gens de la U3S salvatge i del mutant U3S-C73R s'ha emprat la tècnica de la PCR a temps real. L'experiment s'inicia amb l'obtenció d'ARN de la mostra. Per aquesta fi s'ha emprat l'extracció d'ARN amb TRIzol[®], seguint el protocol de la casa comercial, que inclou una primera fase d'homogeneïtzació de la mostra, una separació de fases, una precipitació de l'ARN, un pas de neteja i finalment l'obtenció de l'ARN total de la

mostra. Un cop obtingut aquest, s'ha comprovat que l'ARN extret no hagi patit cap procés de degradació mitjançant electroforesi en gel d'agarosa a l'1% (veure procediment a l'apartat **III.1.1.d**):

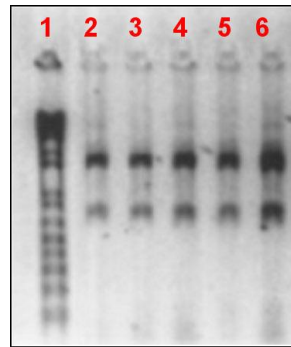


Figura IV.32. Resultats de l'extracció d'ARN analitzats per electroforesi en gel d'agarosa a l'1%. Marcadors de pes molecular d'1 kb (Figura IV.30) al carril 1. Al carril 2, M1:289wt (cèl·lules M1 transfectades amb el vector p289 i el gen de la U3S salvatge). Al carril 3, M1:289C73R. Al carril 4, M1:437wt. Al carril 5, M1:437C73R. Al carril 6, M1 control.

Com es pot observar en la Figura IV.32, l'absència de bandes a pesos moleculars inferiors demostren que l'ARN de les mostres no presenta degradació. Un cop s'han tractat les mostres d'ARN amb DNases (enzims que degradaran l'ADN), es procedeix a la retrotranscripció a ADNc, mitjançant una retrotranscriptasa (enzim capaç de fer la reacció inversa a la transcripció). S'han emprat encebadors que hibriden específicament amb l'ARNm de la mostra per tal que l'enzim generi una cadena d'ADN complementària a aquest ARNm.

Amb l'ADNc obtingut a l'experiment anterior, s'ha realitzat la PCR a temps real. S'han emprat quatre tipus d'encebadors diferents (detalls dels encebadors a l'apartat **III.6.4.**): els Par1, que hibriden amb la construcció 289wt i 289C73R; els Par2, que hibriden amb la construcció 437wt i 437C73R; els encebadors ARP que hibriden amb el gen constitutiu ARP i els encebadors per *neo* que hibriden amb el gen de la fosfotransferasa. El gen *neo* és el que codifica per la fosfotransferasa de neomicina II, o NFT II, que degrada l'antibiòtic neomicina i es fa servir com a agent de selecció, juntament amb la kanamicina, en cèl·lules procariotes. En eucariotes en canvi, es sol utilitzar l'antibiòtic de selecció G418, o geneticina[®] (GIBCO BRL Life Technologies, Inc.). L'acció antibiòtica del G418 està basada en la seva capacitat de bloquejar la síntesi proteica per inhibició de l'elongació dels pèptids.⁴¹

ARP i *neo* es fan servir com a controls de l'expressió gènica degut a que el gen ARP codifica per una proteïna ribosòmica que s'expressa a les cèl·lules utilitzades de forma constitutiva, per tant, pot ser utilitzat com a control per la PCR a temps real i el gen *neo* es troba clonat dins dels vectors emprats en la transfecció de les cèl·lules. Com que aquestes han sigut crescudes en presència de G418, l'extracte d'ARNm de les mostres contindrà el missatger d'aquest gen de resistència.

A la Figura IV.33 s'observa el resultat de la PCR a temps real, on es demostra que els encebadors dissenyats són específics, ja que s'han obtingut bandes definides de la mida esperada en tots els casos. En el gel de l'esquerra s'observen els resultats per a les construccions 289wt i 289C73R, mentre que a la dreta es recullen els resultats per a les construccions 437wt i 437C73R. En la fila ARP, s'observen les bandes corresponents a la senyal de la seqüència d'ARP reconeguda pels encebadors específics que mostra amplificació en totes les condicions, tant en els controls (M1) com en les cèl·lules transfectades amb les construccions amb *myc* (289wt, 289C73R, 437wt i 437C73R). Tractant-se d'un gen constitutiu, la banda de ARP és indicativa de que el procés de transcripció inversa i posterior PCR a temps real ha funcionat, i es pot utilitzar com a referent per a l'anàlisi dels resultats de la PCR a temps real.

Com s'ha comentat, el gen *neo* es troba en el mateix plasmidi emprat per a la transfecció dels gens U3S salvatge i del mutant U3S-C73R. Tal i com s'observa en la Figura IV.33, els controls M1 no presenten ARNm ni del gen *neo* ni dels gens U3S salvatge unida a *myc* o del mutant C73R unit a *myc*. L'estratègia escollida en el disseny dels encebadors específics permet diferenciar la transcripció del gen de la U3S endògena del de la clonada (veure la figura III.12). En el cas de les cèl·lules transfectades, s'obté senyal positiu tant per a l'ARNm del gen de la U3S unida a *myc*, com pel gen del mutant U3S-C73R unit a *myc*, així com per l'ARNm del gen de la neomicina. Aquests resultats demostren que els encebadors són específics per a l'ADNc de la U3S clonada. A més, en ambdues construccions, tant en el cas on la seqüència de reconeixement *myc* es troba en la posició C-terminal (p289) com en la posició N-terminal (p437), els gens de la U3S salvatge i del mutant U3S-C73R mostren expressió.

En les cèl·lules M1, i segons les intensitats relatives dels gels de comprovació de la PCR a temps real (Figura IV.33), sembla que existeix més expressió de la U3S salvatge com de la mutant C73R quan la seqüència de reconeixement *myc* es troba situada a l'inici de la cadena polipeptídica (en la posició N-terminal). Per altra banda, quan la seqüència *myc* es situa a l'extrem C-terminal d'ambdues construccions sembla ser que el gen del mutant U3S-C73R té una major transcripció que el gen de la proteïna salvatge.

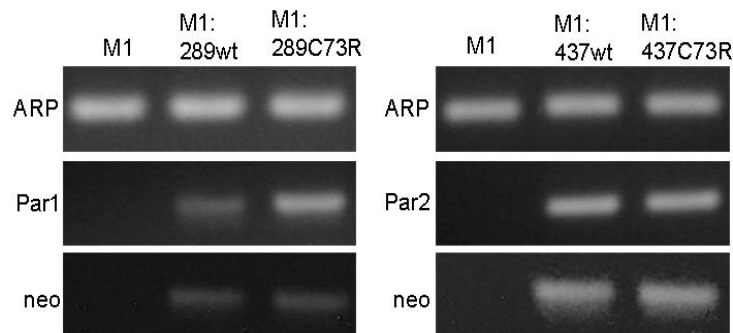


Figura IV.33. Gels d'agarosa al 2.5% amb els resultats de la PCR a temps real. S'observen sis fragments de gel que corresponen a les amplificacions del fragment d'ADNc dels gens

ARP, *neo*, i els de la U3S i C73R amb les seqüències *myc* unides (a l'esquerra s'observen els resultats de les construccions 289wt i 289C73R, i a la dreta els resultats de les construccions 437wt i 437C73R, amb els controls respectius).

L'anàlisi dels resultats s'ha dut a terme mitjançant una quantificació relativa amb el mètode de $2^{-\Delta\Delta CT}$.⁴² Aquest mètode permet realitzar una comparació del nivell d'expressió d'un gen d'interès respecte a gens que es consideren constitutius (veure apartat III.6.4). S'ha decidit emprar la quantificació relativa enlloc d'una quantificació absoluta del número de còpies transcrites, ja que la informació que es pretén obtenir amb aquest experiment és determinar si hi ha o no expressió, i si existeixen diferències d'expressió entre ambdós gens.

Els resultats de l'expressió gènica dels gens de la U3S salvatge i del mutant C73R clonats es resumeixen a la Figura IV.34. Les dues primeres columnes corresponen als valors de Ct obtinguts amb els encebadors Par1 normalitzats amb el gen *neo*. Aquests resultats demostren el que ja s'observava en el gel de la PCR a temps real: s'observa més transcripció del gen del mutant U3S-C73R comparat amb el de la proteïna salvatge en les condicions assajades. En les columnes tres i quatre s'observa el resultat de la transcripció del gen *neo* normalitzat amb el gen ARP, i s'observa que en les dues transfeccions fetes amb el vector p289 la transcripció del gen *neo* no es veu alterada, i que aquesta té el mateix nivell de transcripció que el gen constitutiu ARP.

Les quatre últimes columnes de la Figura IV.34 corresponen a l'expressió de les construccions dutes a terme amb el vector p437. Segons aquests resultats, sembla no existir diferència entre els nivells de transcripció del gen de la U3S salvatge i del mutant. Tot i això, observant amb més detalls els resultats de la transcripció de *neo* normalitzades amb els valors d'ARP, la transcripció del gen que codifica per la NFT II és sensiblement inferior en el cas del mutant U3S-C73R. Si es considera que els gens *neo* i el de les proteïnes d'interès es troben regulades sota el mateix promotor, aquest resultat és indicatiu d'una menor transcripció del plasmidi 437C73R respecte al 437wt. La observació del mateix nivell de transcripció dels gens de la U3S salvatge i del mutant U3S-C73R implica una major expressió de la proteïna U3S-C73R amb respecte a la proteïna U3S salvatge.

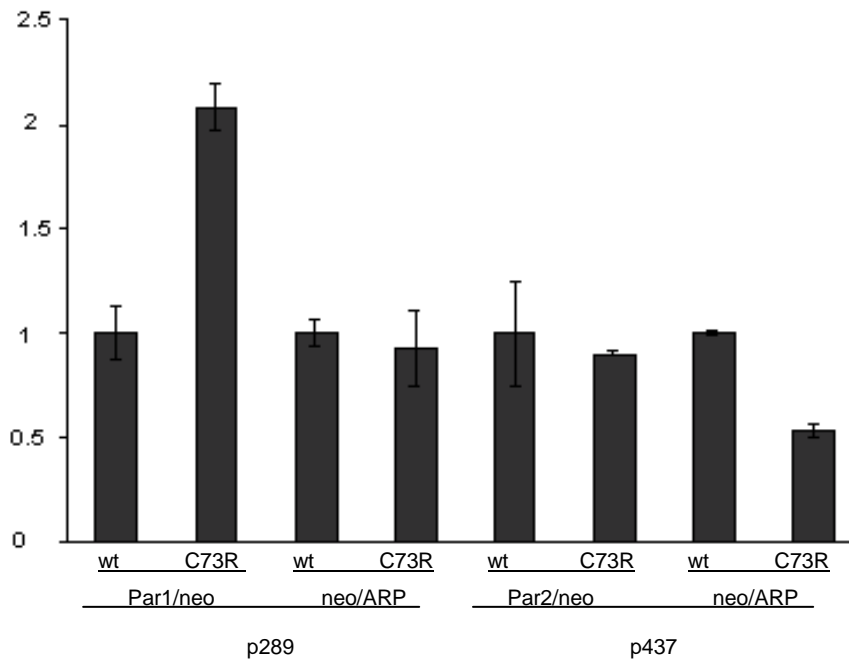


Figura IV.34. Resultat de la PCR a temps real per determinar l'expressió dels gens U3S salvatge i del mutant C73R clonats dins de les cèl·lules M1.

Els resultats del control d'expressió dels gens de la U3S salvatge i de la proteïna U3S-C73R demostren que en tots els constructes generats per a l'estudi *in vivo* de la U3S es transcriu el gen de la proteïna d'interès i, per tant, l'estratègia pot permetre l'estudi d'aquest enzim en cèl·lules humanes. D'altra banda, els resultats apunten una major transcripció del gen mutant respecte a la proteïna salvatge. Una possible explicació rau en una alteració de les condicions normals de les cèl·lules en les quals s'està transcrivint el gen mutant: en ambdós casos la sobreexpressió d'una proteïna determinada genera un estrès citològic, però en el cas de la proteïna mutant, aquest estrès pot veure's incrementat si el mutant afecta d'una manera més acusada la bioquímica cel·lular. La conseqüència d'aquest estrès pot explicar una alteració en els nivells de transcripció globals que donessin lloc a aquesta diferència d'expressió entre una proteïna i l'altra. En tot cas, i dins del context de la porfíria eritropoiètica congènita, la raó de la patogènia del mutant U3S-C73R s'ha de buscar a nivell de proteïna, ja que sí que té lloc el procés de transcripció d'aquest gen.

IV.3.2.2. Comparació del nivell de traducció del gen salvatge i del gen C73R

Per determinar si existeix diferència entre la traducció de les proteïnes U3S salvatge i el mutant U3S-C73R, s'ha dissenyat un experiment d'immunotransferència de proteïnes amb cèl·lules M1 (apartat III.6.1.1.) transfectades de forma estable amb el gen de la U3S salvatge i del mutant U3S-C73R. Es treballa amb les mateixes mostres de fibroblast humà que en els experiments de transcripció gènica per tal de que es puguin comparar amb aquests resultats. S'han obtingut els extractes proteics de les següents mostres:

- M1, control de fibroblasts humans,
- M1:289_wt, cèl·lules transformades amb el clon U3S salvatge en el vector p289,
- M1:289_C73R, cèl·lules transformades amb el clon C73R en el vector p289,
- M1:437_wt, cèl·lules transformades amb el clon U3S salvatge en el vector p437,
- M1:437_C73R, cèl·lules transformades amb el clon C73R en el vector p437.

Tan el vector p289 com el vector p437 proporcionen un producte proteic unit a una seqüència *myc* que en facilita la detecció amb un anticòs específic per a *myc*. La diferència principal entre els dos vectors és que en el cas del vector p289 la seqüència *myc* es troba unida a la part terminal de la proteïna, mentre que en el cas del vector p437 la seqüència de reconeixement *myc* es troba a l'inici de la proteïna. La utilització d'un anticòs contra l'epítot *myc* permetrà detectar la presència de la construcció amb la proteïna U3S.

Ambdós vectors contenen el gen que codifica per la Neomicina Fosfo-Transferasa II (NFT II), la qual proporciona resistència per a la kanamicina i la neomicina en bacteris, i per a la Geneticina[®] (o G418) en cèl·lules de mamífer. Aquests antibiòtics s'uneixen a components ribosòmics i inhibeixen la síntesi proteica. La NFT II inhibeix l'acció d'aquests antibiòtics via fosforilació, es creu que mitjançant interferència amb el transport actiu dins de la cèl·lula. Les immunotransferències dels lisats cel·lulars amb NFT II es poden utilitzar per mesurar les eficiències de transfecció relatives en experiments on s'han realitzat transfeccions múltiples en paral·lel amb diferents plasmidis.

Els resultats de la immunotransferència de les proteïnes U3S salvatge i U3S-C73R es recullen en la Figura IV.35, on no s'observa senyal específica ni per a la U3S ni per a *neo* en les cèl·lules control M1 (primer carril), mentre que sí s'observa senyal de les proteïnes Hsp70, Hsp90 i tubulina. En els carrils 2 i 4 es pot veure la presència d'U3S salvatge, mentre que la proteïna mutant U3S-C73R és absent (carrils 3 i 5).

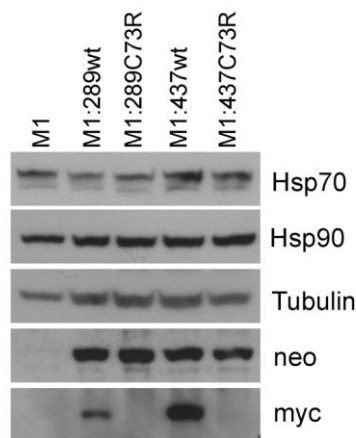


Figura IV.35. Immunotransferència de proteïnes de la expressió del producte dels gens U3S salvatge i mutant U3S-C73R en cèl·lules M1. Els anticossos emprats són Hsp70, Hsp90, Tubulina, *neo*, i *myc*.

Les proteïnes endògenes de control emprades suggereixen que en totes les mostres el nivell d'expressió és equivalent (senyal de la tubulina a la Figura IV.35). Per altra banda, les xaperones Hsp70 i Hsp90, induïbles sota condicions d'estrès,^{43,44,45} indiquen que l'expressió de la proteïna U3S salvatge i el mutant U3S-C73R no provoquen un estrès afegit en els cultius. El fet que no s'observi la proteïna mutant U3S-C73R podria explicar-se degut a una eliminació del plasmidi amb el gen corresponent en els cultius estables, però aquesta hipòtesi és improbable degut a que aquest plasmidis contenen al seu torn el gen codificant per a la Neomicina Fosfo-Transferasa II (NFT II, o *neo*). El fet d'obtenir senyal similar de l'enzim NFT II en les línies cel·lulars demostra que totes elles contenen els plasmidis emprats en la clonació.

Així doncs, i tenint present l'estudi de la transcripció dut a terme en l'apartat **IV.3.2.1**, tot i observar una major transcripció del gen que codifica per al mutant U3S-C73R, no s'observa el producte proteic. Una hipòtesi és que l'ARNm del mutant no pot madurar per donar lloc a la proteïna mutant. Per altra banda, també és plausible que la síntesi de la proteïna mutant es completi, però la proteïna es degrada sense possibilitat d'acumular-se en la cèl·lula, explicant així la seva no-detecció. La baixa estabilitat trobada *in vitro* d'aquesta proteïna mutant, apuntarien cap a aquesta darrera hipòtesi.

IV.3.3. Efectes de la mutació C73R en la localització cel·lular de la U3S en eucariotes

IV.3.3.1. Localització en cèl·lules transfectades

Amb l'objectiu de determinar la localització subcel·lular de les proteïnes U3S salvatge i U3S-C73R, s'han clonat els gens respectius i s'han expressat en les dues línies cel·lulars humanes (Huh7 i M1). Les mostres s'han analitzat mitjançant microscòpia òptica de fluorescència. En totes les mostres s'ha utilitzat una solució de formaldehid com a fixador, ja que s'ha vist que els anticossos emprats reconeixen millor les proteïnes en aquestes condicions. De fet, els aldehids generalment preserven les estructures lipídiques com les membranes, més que els alcohols, que extreuen els lípids i en precipiten les proteïnes. El metanol sol ser més efectiu en la fixació per la localització d'elements del citoesquelet.⁴⁶

Per altra banda, i en les condicions en les quals s'ha realitzat la fixació i l'observació de les mostres, tan l'anticòs monoclonal contra la U3S com l'anticòs policlonal contra la U3S emprats produeixen molt soroll de fons a les imatges, segurament per interacció inespecífica o bé per interacció amb la U3S cel·lular endògena. Per aquesta raó, els experiments de localització s'ha realitzat amb les construccions que contenen les cues de detecció *myc* i EGFP, desestimant les construccions 054wt i 054C73R.

Els primers resultats obtinguts de la localització de la proteïna U3S unida a EGFP en cèl·lules **Huh7** transfectades de forma transitòria (és a dir, transfectades i fixades entre les 12 h i les 24 h posteriors a la transfecció) mostren que el percentatge de la transfecció dels cultius d'aquests hepatòcits humans no és gaire elevat. Tot i això, es van poder enregistrar imatges d'algunes cèl·lules transfectades expressant la proteïna U3S (Figura IV.36).

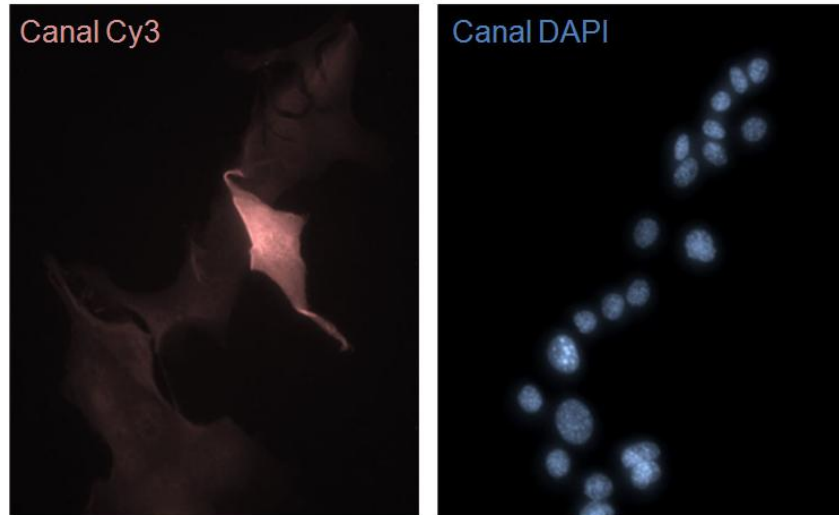


Figura IV.36. Imatges de microscòpia òptica de fluorescència de cèl·lules Huh7 expressant la proteïna U3S salvatge (construcció EGFP-U3Swt; anticòs primari per detectar EGFP), en els canals Cy3 i DAPI. Imatges adquirides amb l'objectiu d'oli de 63 augments i un ocular de 10augments, amb el microscopi Zeiss Axiovert200, i el programa AxioVision pel processat.

En la Figura IV.36 les cèl·lules Huh7 no tenen una morfologia típica d'hepatòcit degut a una fixació amb formaldehid amb quantitat insuficient, que ha donat lloc a una mala fixació de les mostres. En la imatge enregistrada pel canal de fluorescència Cy3 s'observa una cèl·lula Huh7 expressant la construcció EGFP-U3Swt, ja que l'anticòs secundari emprat per detectar l'anticòs de reconeixement de l'epítip EGFP conté un cromòfor que s'excita a uns 550 nm i emet fluorescència a 570 nm de longitud d'ona. En el canal del DAPI, s'observa el mateix camp de la mateixa mostra però detectant els nuclis presents, ja que el cromòfor DAPI té el seu màxim d'emissió de fluorescència a 461 nm (el màxim d'absorció del DAPI és a 358 nm).

L'anàlisi les imatges obtingudes dels cultius de cèl·lules Huh7 transfectades (per exemple la Figura IV.36) no ha permès determinar la localització cel·lular de la proteïna U3S. Tot i apuntar cap a algun tipus de localització citoplasmàtica o lligada a algun orgànel citoplasmàtic, el nombre de cèl·lules transfectades i les imatges obtingudes no són prou concloents. La repetició d'aquest experiment no ha permès l'augment de cèl·lules que expressin les proteïnes U3S (tan en el cas de la salvatge com en el cas de la mutant). Cal doncs, trobar un mètode per obtenir un major nombre de cèl·lules transfectades que permetin determinar-ne la localització.

S'ha observat expressió de la proteïna mutant U3S-C73R, si bé que en un nombre molt limitat de cèl·lules, corroborant la segona hipòtesi plantejada en l'apartat **IV.3.2.2**: el gen que codifica per la proteïna U3S-C73R s'expressa, donant lloc a la proteïna en qüestió. que pateix una ràpida degradació en l'entorn cel·lular.

En el cas de les cèl·lules **M1** transfectades, en general s'observa un baix nombre de cèl·lules que contenen el clon de la proteïna U3S. En la Figura IV.37 es recullen algunes imatges de microscòpia òptica obtingudes a partir de cultius estables transfectats amb les construccions 553wt (amb el gen codificant per la proteïna U3S salvatge) i 553C73R (amb el gen codificant per la proteïna mutant U3S-C73R).

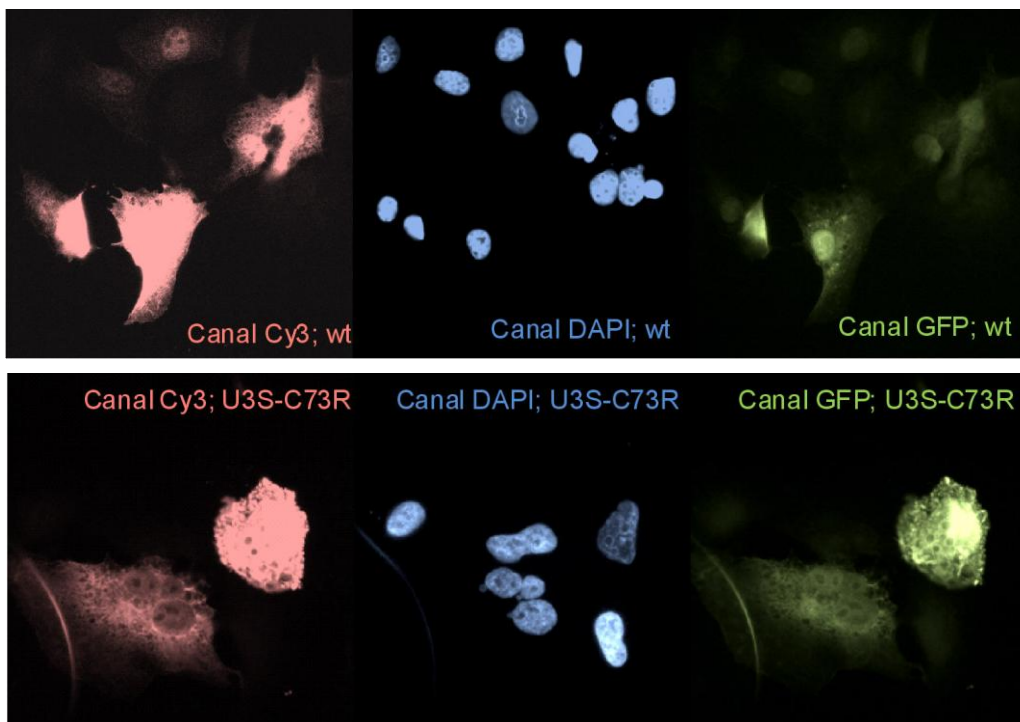


Figura IV.37. Imatges de línies cel·lulars estables M1 transfectades amb la construcció 553wt (*wt* a les imatges), que conté el gen que codifica per la U3S salvatge), i amb la construcció 553C73R (*U3S-C73R* en les imatges), amb el gen codificant pel mutant U3S-C73R. Les imatges s'han enregistrat pel canal Cy3 (on es detecta la U3S), pel canal DAPI (on es detecten els nuclis), i pel canal EGFP (canal per on es detecta la EGFP), adquirides amb l'objectiu d'oli de 63 augments i un ocular de 10 augments. El microscopi utilitzat és un Zeiss Axiovert200, i el programa AxioVision pel processat.

En les imatges obtingudes dels fibroblasts M1 transfectats amb les construccions 553wt i 553C73R es pot observar com ambdues proteïnes (nativa i mutant) s'expressen, ja que s'observa la fluorescència del cromòfor Cy3, unit als anticossos policlonals de ratolí emprats en la localització de la U3S (apartat **III.6.5.2.**), així com la fluorescència directa de la proteïna EGFP unida en aquestes construccions. Pel que fa a la localització, les imatges obtingudes amb el microscopi òptic de fluorescència, no han permès de determinar la localització

intracel·lular de les proteïnes, tot i que aquests resultats preliminars tornen a apuntar cap a una localització citoplasmàtica, ja sigui en forma lliure o d'agregat.

En general, en totes les imatges d'immunofluorescència obtingudes tan pels cultius de cèl·lules transfectades Huh7 com per les M1, s'observa un baix índex de cèl·lules que contenen senyal per la proteïna U3S, tant en el cas de la salvatge com en el cas del mutant U3S-C73R. Una de les primeres conclusions que se n'extreu és que cal generar línies estables amb un major índex de transfecció, ja sigui millorant el procés de clonació, o bé mitjançant l'enriquiment d'aquelles cèl·lules que expressen una major quantitat de proteïna. En aquest sentit, la selecció de les línies estables s'ha de fer mitjançant la selecció de clons positius en lloc de per selecció per antibiòtic únicament.

La tècnica de selecció per clons parteix d'una transfecció amb cultius més diluïts de manera que en aplicar el medi amb l'antibiòtic de selecció queden poques cèl·lules resistents a la placa. Quan aquestes cèl·lules creixen ho fan en forma de petits grups de cèl·lules que parteixen d'una mateixa cèl·lula mare (clons). Aquests clons s'aïllen i es fan créixer en plaques individuals, fins a assolir una línia estable que ja es podrà examinar per determinar-ne el grau d'expressió. Aquestes línies cel·lulars requereixen un temps llarg de selecció per eliminar aquelles cèl·lules que creixen a expenses de la resistència de les cèl·lules veïnes. En el present treball, les línies estables obtingudes no provenen d'un mateix clon, de manera que dins del mateix cultiu poden trobar-se cèl·lules amb divers grau d'expressió de les proteïnes clonades.

Si es considera que la baixa quantitat de cèl·lules positives del cultiu és degut a la ràpida degradació de la sintasa, aleshores es pot enfocar la cerca en la direcció d'evitar la via de degradació de la U3S, o alentir-ne l'eliminació cel·lular. En aquest sentit, s'han plantejat una sèrie d'experiments que inclouen tant xaperones químiques com un inhibidor del proteasoma, amb l'objectiu de millorar l'estabilitat de la U3S dins la cèl·lula, alentir-ne i/o evitar-ne la degradació (apartat **IV.3.4.**).

IV.3.4. Efectes de xaperones químiques en l'expressió i localització cel·lular de la U3S en eucariotes

La fidelitat del plegament proteic dins una cèl·lula sovint és ajudat per un tipus de proteïnes que es coneixen com a xaperones moleculars,⁴⁷ que són capaces de discriminar entre proteïnes desplegadas i plegades, interaccionant amb els polipèptids que s'estan sintetitzant i/o ajudant al transport d'aquestes cadenes peptídiques. En múltiples malalties l'activitat d'aquestes xaperones es veu alterada. Aquest és el cas de la fibrosi quística, on una sola mutació puntual en la proteïna *regulador de la conductància transmembrana de la fibrosi quística* (CFTR, per les seves sigles en anglès) impedeix la interacció entre aquesta i les xaperones que en condicions normals l'ajudarien en el plegament.

Estudis amb proteïnes desplegadas que tendeixen a formar precipitats cel·lulars han portat al descobriment de les xaperones químiques: un seguit de molècules estabilitzants que a nivell cel·lular poden alentir aquest procés de desplegament proteic. Entre d'elles se'n coneixen el glicerol, el dimetilsulfòxid (o DMSO) i el 4-fenilbutirat de sodi (o PBA). Les xaperones químiques influencien en la taxa o la fidelitat de la reacció de plegament, probablement perquè actuen estabilitzant la forma plegada del polipèptid (i desestabilitzant la forma desplegada). Per exemple, el glicerol tendeix a quedar exclòs de les immediacions de la cadena peptídica que s'està sintetitzant. A elevades concentracions de glicerol, aquest actua incrementant la hidratació relativa al voltant del polipèptid. Com a resposta, el polipèptid tendeix a decreïxer la seva àrea superficial relativa, replegant-se sobre sí mateix. Aquesta modulació de l'efecte hidrofòbic actua afavorint l'estabilitat de la proteïna.

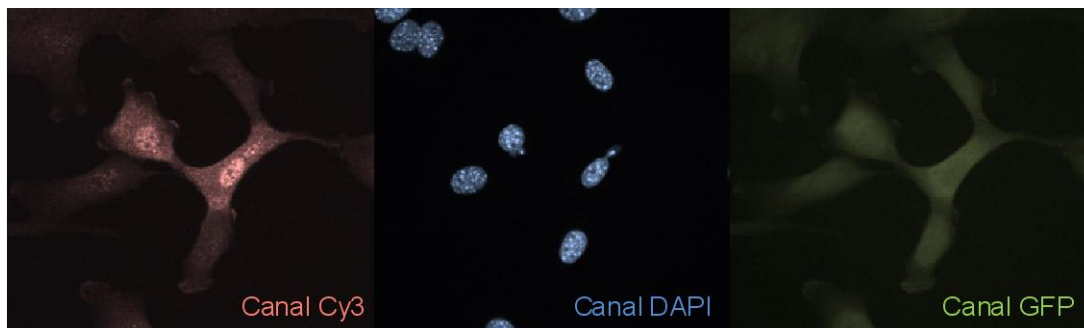
El DMSO, per contra, es tracta d'un potent solvent polar, miscible en aigua i en molts líquids orgànics. Els efectes que el DMSO exerceix sobre les proteïnes son de natura extremadament variada: pot actuar d'estabilitzador, de desnaturalitzant, d'inhibidor, d'activador, i de crioprotector. A més, s'ha vist que aquest compost pot actuar com a xaperona química ja que millora el plegament d'algunes proteïnes com l'aminocilasa, accelerant la formació de nuclis hidrofòbics durant el plegament proteic.⁴⁸ En el cas del PBA, també s'ha descrit com a xaperona química pels efectes que s'ha vist que té en la disminució d'alguns agregats proteics.⁴⁹

IV.3.4.1. Anàlisi per microscòpia òptica

Inicialment s'ha estudiat l'efecte de les xaperones químiques glicerol i DMSO en les cèl·lules MLP29. S'ha escollit treballar amb les cèl·lules MLP29 ja que les línies obtingudes presenten una major expressió global de les proteïnes U3S salvatge i el mutant U3S-C73R respecte a les cèl·lules Huh7 i M1. En concret, les construccions realitzades amb la proteïna de fusió EGFP

han donat un rendiment més bo de transfecció. A la Figura IV.38 es poden observar algunes imatges obtingudes de l'expressió de la proteïna U3S salvatge i els diferents tractaments amb glicerol i DMSO.

- MLP29:607_wt, control:



- MLP29:607_wt, 0.5% glicerol:

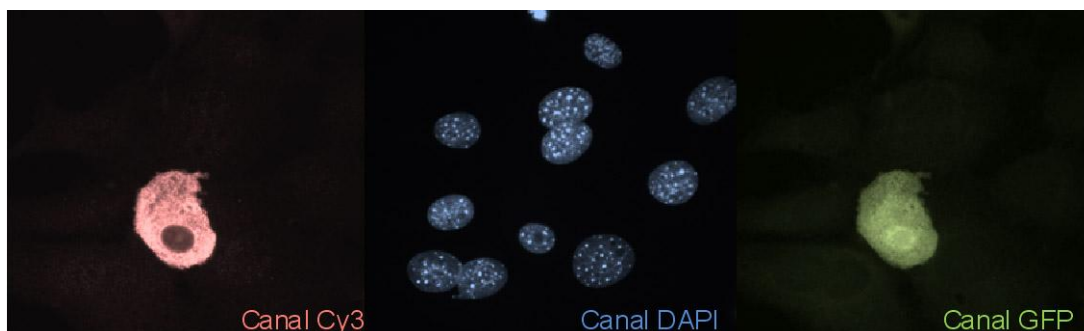


Figura IV.38. Imatges de microscòpia òptica de fluorescència de cèl·lules MLP29 transfectades amb la construcció 607wt, amb el tractament de 0.5% de glicerol. El control són cèl·lules crescudes i recollides en les mateixes condicions que les tractades amb glicerol (72 h). Imatges adquirides amb l'objectiu d'oli de 63 augments i un ocular de 10augments, amb el microscopi Zeiss Axiovert200, i el programa AxioVision pel processat.

Els resultats dels experiments amb glicerol i DMSO a les concentracions 0.5% i 5% han mostrat que el DMSO resulta tòxic tant per a les cèl·lules que expressen la proteïna U3S salvatge com per les que expressen el mutant U3S-C73R, ja que a les 24 h ja s'observa apoptosi en una gran part de les cèl·lules.

En el cas del glicerol, s'han obtingut resultats rellevants: si bé que el tractament amb glicerol al 5% també ha resultat nociu per les cèl·lules, en el cas dels cultius tractats amb 0.5% de glicerol, s'ha pogut observar algunes cèl·lules que expressaven més quantitat de U3S que en el cas de les mostres control. Aquest resultat es pot observar a la Figura IV.38, on s'aprecia una intensitat del senyal de fluorescència molt més elevat en les cèl·lules que expressen la U3S respecte les cèl·lules que no l'expressen en el cas de les cèl·lules incubades amb glicerol. Aquest fenomen té lloc tant en el cas de la proteïna salvatge com en el cas del mutant U3S-

C73R (resultats no mostrats), però la quantitat de cèl·lules supervivents dels cultius respectius no és molt elevada, i s'observa una alteració important en la morfologia d'aquestes cèl·lules.

Així doncs, el tractament amb glicerol al 0.5% reté la presència de la proteïna U3S en les cèl·lules, donant lloc a un senyal de fluorescència més intensa. Per altra banda, tan la xaperona química DMSO com el glicerol, acaben resultant tòxics en les concentracions en les quals s'ha treballat. Això pot ser degut a que o bé en aquestes línies cel·lulars creades (que expressen la U3S) els dos compostos resulten nocius per a la supervivència del cultiu, o bé perquè l'acumulació excessiva de la proteïna U3S a la cèl·lula resulti tòxica i n'acabi provocant l'apoptosi. De les imatges obtingudes se'n pot extreure que possiblement la localització cel·lular de la proteïna U3S sigui el citoplasma de les cèl·lules, però cal encara optimitzar les mostres per aconseguir-ne millors imatges, i poder estudiar-les amb microscòpia confocal. El microscopi confocal, a diferència de l'òptic, permet obtenir imatges de les mostres per seccions o plans, de manera que resulta més acurat per determinar la localització de proteïnes a nivell cel·lular.

A banda de la utilització de xaperones químiques, també s'ha explorat el compost MG132, un inhibidor del proteasoma, per tal de millorar la localització cel·lular de la U3S amb l'objectiu de determinar si la via de degradació de la proteïna U3S té lloc en aquest orgànu, com és el cas de nombroses proteïnes cel·lular i, per altra banda, veure si el MG132 pot ser útil en la retenció de l'activitat U3S intracel·lular, a fi de considerar aquest compost com a una teràpia contra la porfíria eritropoietica congènita. De fet, aquesta molècula resulta una atractiva candidata en la teràpia contra alguns tipus de càncer,^{50, 51} degut a la implicació del proteasoma en algunes d'aquestes malalties.

El proteasoma és el sistema cel·lular més important de degradació de proteïnes. Perquè una proteïna sigui reconeguda i degradada per aquest sistema és necessari un marcatge amb ubiquitina. La ubiquitinació és un mecanisme de senyalització, com ho són la glicosidació o la fosforilació. La utilització del compost MG132 inhibeix aquest mecanisme de degradació, per la qual cosa, en analitzar per immunotransferència un extracte cel·lular amb el sistema proteasoma-ubiquitina bloquejat, s'observen les proteïnes que s'haurien degradat sense la presència de l'inhibidor.

Recents experiments han mostrat que, incubant les cèl·lules durant més temps en presència del compost MG132, el nombre de cèl·lules que expressen la U3S s'incrementa de forma substancial, confirmant que la via de degradació de la proteïna U3S és el proteasoma. Així doncs, inhibint-lo és possible que la cèl·lula retengui la proteïna U3S (i per tant és d'esperar que també es retengui l'activitat sintasa).

Observant les imatges de les poques cèl·lules positives que s'havien obtingut fins ara, es pot veure com la localització no varia amb les cèl·lules tractades amb MG132, però ara s'obté un

major nombre de positives que permeten formular la hipòtesi de que la proteïna U3S salvatge té una localització citoplasmàtica, i no sembla associada a cap tipus d'estructura cel·lular, mentre que la proteïna mutant U3S-C73R es presenta com a agregats o acumulacions que podrien també podries ser citoplasmàtiques (Figura IV.39). Amb tot, s'observa una diferència del patró de localització entre la sintasa salvatge i el mutant U3S-C73R. Donat que la proteïna mutant U3S-C73R presenta una estabilitat *in vitro* molt més baixa que la proteïna U3S salvatge (apartat IV.2.4.), no és d'estranyar que a nivell cel·lular aquest mutant pateixi un procés d'agregació, produint la inactivació de la sintasa i per tant, donant lloc a un fenotip porfiric.

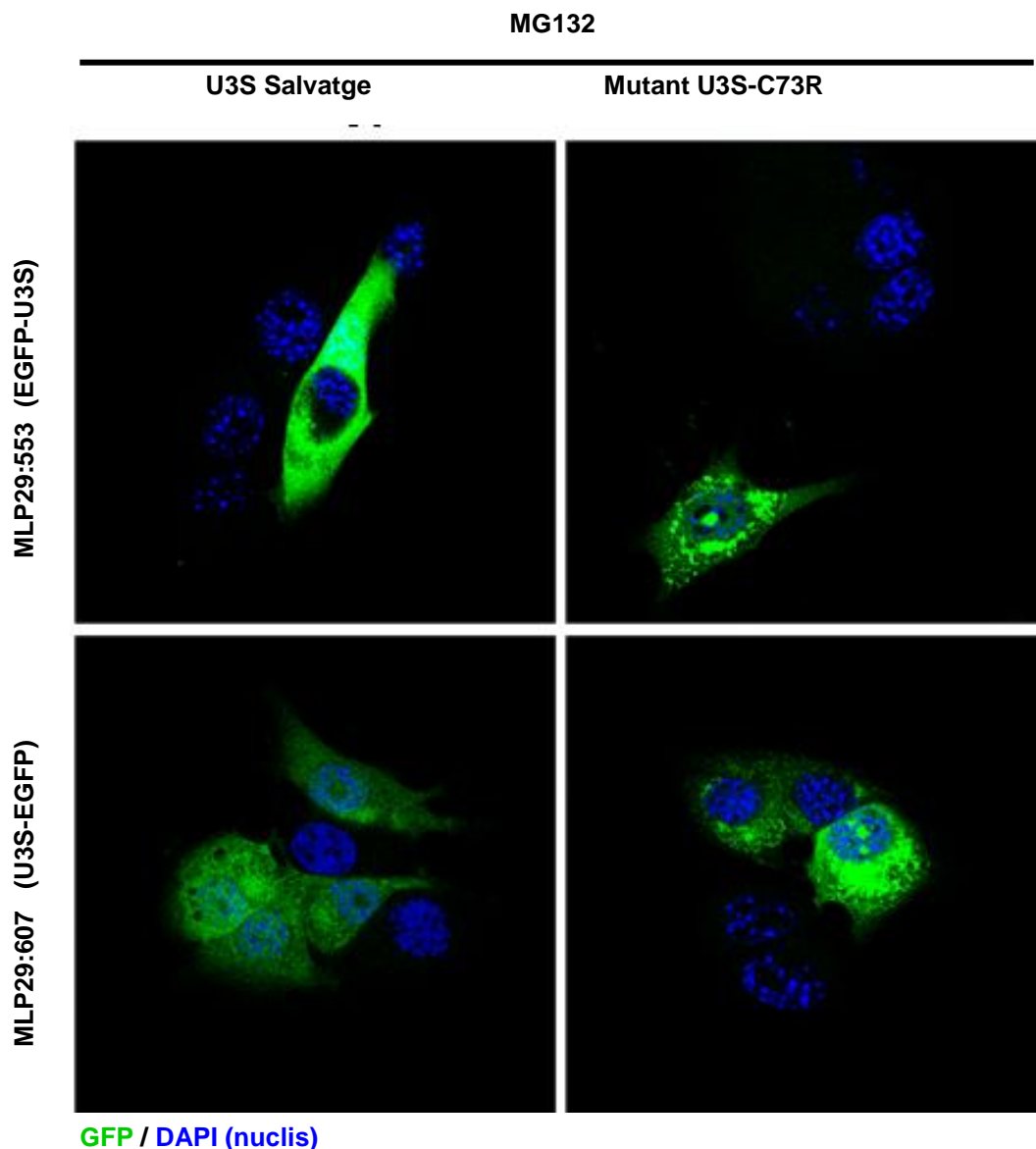


Figura IV.39. Imatges de microscòpia confocal obtingudes dels següents cultius cel·lulars: MLP29:553_wt, MLP29:553_C73R, MLP29:607_wt i MLP29:607_C73R, incubats en presència de l'inhibidor del proteasoma MG132. En verd s'observa el senyal de EGFP i en blau el senyal DAPI dels nuclis, emprant l'objectiu d'oli de 63 augments i el programa Leica Confocal. El microscopi utilitzat ha sigut un microscopi confocal multifotó Leica TCS SP.

Comparant les imatges obtingudes d'immunofluorescència d'aquests experiments (Figura IV.39) amb les que s'havien obtingut de la localització de la U3S en cèl·lules transfectades en presència de xaperones químiques (Figura IV.38), és que hi ha un major nombre de cèl·lules transfectades en els cultius tractats amb el MG132 durant 18 h. Tenint en compte que es tracta de les mateixes línies cel·lulars, tot sembla indicar que el compost MG132 estabilitza la proteïna U3S a l'interior cel·lular, evitant-ne la ràpida degradació que explicaria el baix nombre de cèl·lules positives obtingudes en absència de l'inhibidor.

IV.3.4.2. Anàlisi per immunotransferència de proteïnes

Els resultats per immunotransferència de proteïnes de les mostres de cèl·lules M1 incubades en presència del compost PBA i/o de l'inhibidor del proteasoma MG132 (Taula III.7) es recullen en les Figura IV.40 i 42.

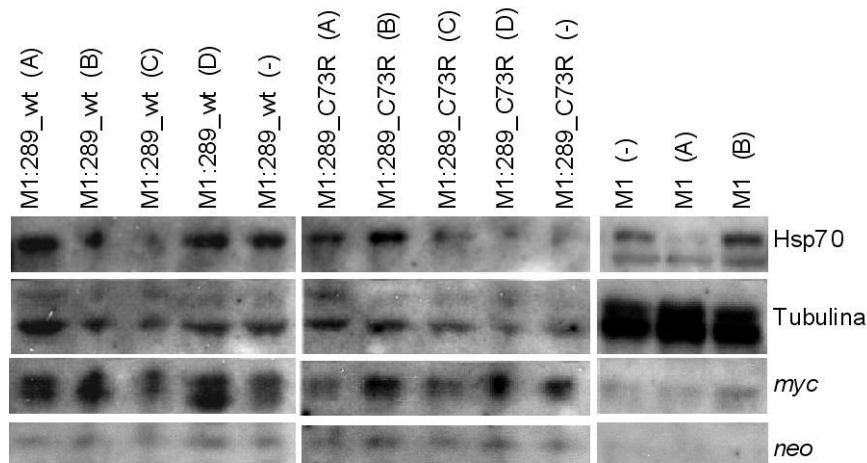


Figura IV.40. Resultats de la immunotransferència de proteïnes de les cèl·lules M1:289_wt i M1:289_C73R amb els tractaments següents: DMSO (A), amb 2 mM de PBA (B), amb 2 mM de PBA+2 μ M de MG132 (C), i amb 2 μ M de MG132 (D). Els controls de l'experiment són el DMSO (A) i els cultius de cèl·lules M1 sense transfectar.

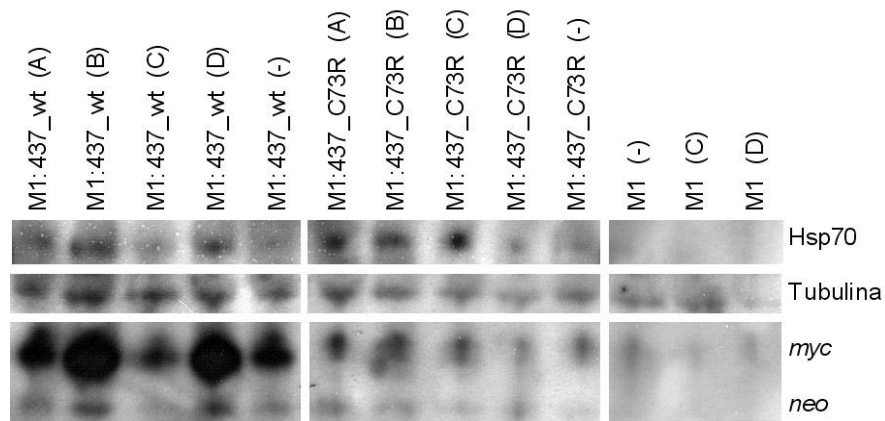


Figura IV.41. Resultats de la immunotransferència de proteïnes de les cèl·lules M1:437_wt i M1:437_C73R amb els tractaments següents: DMSO (A), amb 2 mM de PBA (B), amb 2 mM de

PBA+2 μ M de MG132 (C), i amb 2 μ M de MG132 (D). Els controls de l'experiment són el DMSO (A) i els cultius de cèl·lules M1 sense transfectar.

Es pot observar en la Figura IV.40 com totes les mostres han estat degudament transfectades (senyal *neo* de la NFTII que dona resistència a certs antibiòtics i que es troba clonada al vector p289). Per altra banda, tant les cèl·lules M1:289_wt com les M1:289_C73R expressen U3S (tant la forma salvatge com el mutant U3S-C73R). Això és així perquè s'observa el senyal de *myc*, que és la seqüència de localització que es troba unida a la proteïna U3S (la mida del fragment correspon a la suma d'ambdós pèptids; resultats no mostrats). Observant els controls de les cèl·lules M1 de control (les que no estan transfectades) també s'aprecia un senyal de *myc* residual, degut a que les cèl·lules contenen aquest factor de transcripció de forma natural.

En el cas de les cèl·lules M1:289_wt, la incubació amb l'inhibidor del proteasoma MG132 (carril M1:289_wt (D)) augmenta la concentració de la proteïna U3S en la mostra, ja que comparant els senyals de les mostres M1:289_wt (D) amb les cèl·lules M1:289_wt sense tractament (-), el senyal corresponent a la seqüència *myc* augmenta en el primer cas, mentre que els senyals de les proteïnes d'expressió constitutiva com la tubulina no varien de forma apreciable. Amb aquesta construcció 289wt, no s'aprecien canvis en la incubació amb el compost PBA o amb el control (DMSO).

En el cas de les cèl·lules M1:289_C73R, també s'observa la presència tant de la NFTII com del mutant U3S-C73R, variacions en la quantitat de proteïna total per a cada mostra (tal i com s'observa en el senyal de tubulina) dificulta la interpretació de les dades.

En la Figura IV.41 s'observen resultats de les incubacions de cultius de cèl·lules M1 amb la xaperona química PBA i l'inhibidor del proteasoma MG132 amb les construccions 437wt i 437C73R. En el cas de la proteïna salvatge, el DMSO no té un efecte destacat en les cèl·lules, ja que en les condicions de l'experiment i en els senyals analitzats no s'observen canvis entre aquest i el control M1:437_wt (-). Per altra banda, els dos tractaments que inclouen l'inhibidor del proteasoma MG132 incrementen la quantitat de proteïna U3S salvatge en les mostres. En el cas de la proteïna mutant U3S-C73R expressada a partir de la construcció 437C73R, s'han carregat mostres amb diferent concentració de proteïna, la qual cosa dificulta la interpretació dels efectes dels tractaments.

Aquests resultats preliminars obtinguts a partir dels tractaments amb la xaperona química PBA i/o amb l'inhibidor del proteasoma MG132, apunten que el MG132 afavoreix d'alguna manera la concentració de la proteïna U3S en comparació al PBA, que no sembla tenir un efecte evident en la quantitat de proteïna U3S present en els cultius,. Així doncs, tot indica que la U3S degrada via el proteasoma. Com s'ha comentat a l'apartat anterior, l'interès d'aquesta troballa rau en que si s'inhibeix la via de degradació cel·lular a curt termini es poden obtenir

mostres on les cèl·lules encara mantinguin la proteïna U3S, i per tant, apunten al compost MG132 com a una possible teràpia per a pacients de PEC.

Experiments recents amb l'inhibidor del proteasoma MG132 i amb cèl·lules MLP29 transfectades amb les construccions 553wt, 553C73R, 607WT i 607C73R s'han analitzat per immunotransferència de proteïnes, i es recullen a la Figura IV.42. La membrana amb les proteïnes transferides ha estat incubada en presència dels anticossos descrits a l'apartat III.6.6.

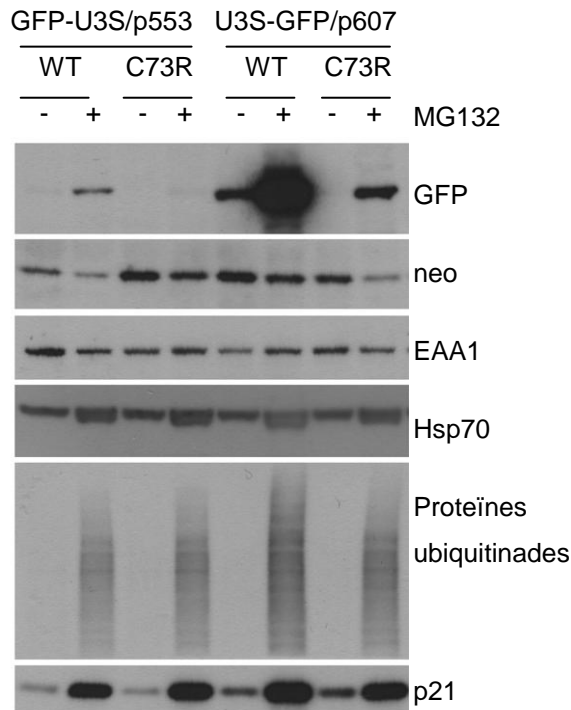


Figura IV.42. Resultats de la immunotransferència de proteïnes dels cultius cel·lulars MLP29:553_wt, MLP29:553_C73R, MLP29:607_wt i MLP29:607_C73R, incubats en presència de l'inhibidor del proteasoma MG132, i sense incubar.

Tal i com s'observa en la Figura IV.42, tant les cèl·lules MLP29:553_wt, MLP29:553_C73R (que generen de producte proteic la proteïna EGFP unida a la U3S) com les cèl·lules MLP29:607_wt i MLP29:607_C73R (les quals donen lloc a la proteïna U3S amb la proteïna EGFP unida a l'extrem C-terminal de la sintasa) expressen el vector de clonació de la U3S, com s'observa en els senyals obtinguts amb l'anticòs contra la Neomicina Fosfo-transferasa II (*neo* a la Figura IV.42). Tanmateix, la presència de la proteïna U3S en les construccions on la proteïna de fusió EGFP es troba a l'extrem N-terminal (construccions 553wt i 553C73R) resulta inapreciable, excepte en el cas de la proteïna salvatge tractada amb l'inhibidor del proteasoma MG132. Pel que fa a les construccions que tenen la proteïna de fusió EGFP a l'extrem C-terminal de la U3S, s'observa com hi ha presència de la U3S salvatge, i que aquesta incrementa en incubar les cèl·lules amb el compost MG132. En el cas del mutant U3S-C73R-EGFP (provinent de la construcció 607C73R), la incubació de l'inhibidor del proteasoma permet la recuperació de la proteïna mutant.

Pel que fa a les proteïnes control, les proteïnes EAA1 s'expressa constitutivament i permet quantificar la proteïna total per mostra. Tal i com es pot apreciar a la Figura IV.42, la quantitat d'extracte proteic carregat per a cada mostra ha estat similar. Autors com D. H. Lee⁵² han descrit que l'inhibidor del proteasoma MG132 fa augmentar la concentració de proteïnes de xoc tèrmic, com per exemple la proteïna Hsp70 (apartat **IV.3.2.2**). Aquesta proteïna augmenta en les mostres tractades amb l'inhibidor MG132, possiblement per l'estrès que implica l'eliminació d'aquesta ruta de degradació de les cèl·lules, i que fa augmentar la concentració intracel·lular de pèptids que d'altra manera serien degradats. Això es reflecteix en l'aparició de les proteïnes ubiquitinades en les mostres sota tractament amb MG132, ja que com s'ha comentat, la ubiquitinació dels pèptids és el senyal que fa que aquests siguin conduïts cap al proteasoma i degradats. I per últim, l'augment de la proteïna p21 és un indicador de l'estrès que pateixen les cèl·lules, ja que la seva expressió és induïble per estímuls d'estrès.

L'efecte de l'inhibidor del proteasoma MG132 en la recuperació de les proteïnes EGFP-U3S i U3S-C73R_EGFP, així com en l'augment de la proteïna U3S-EGFP que s'observen en la Figura IV.42 resulta evident. Aquests resultats recolzen per una banda la hipòtesi de que la degradació de la proteïna U3S té lloc via proteasoma, i reafirmen els resultats *in vitro* que demostren la baixa estabilitat de l'enzim mutant respecte de l'enzim salvatge. Un punt important en la futura recerca de teràpies per a pacients de porfíria eritropoiètica congènita podria ser determinar el grau de recuperació de l'activitat sintasa *in vivo* quan les cèl·lules són tractades amb l'inhibidor MG132.

IV.3.4.3. Anàlisi per citometria de flux

L'anàlisi dels tractaments amb PBA i/o MG132 dels cultius de cèl·lules MLP29 s'ha realitzat mitjançant citometria de flux (veure apartat III.6.6.).

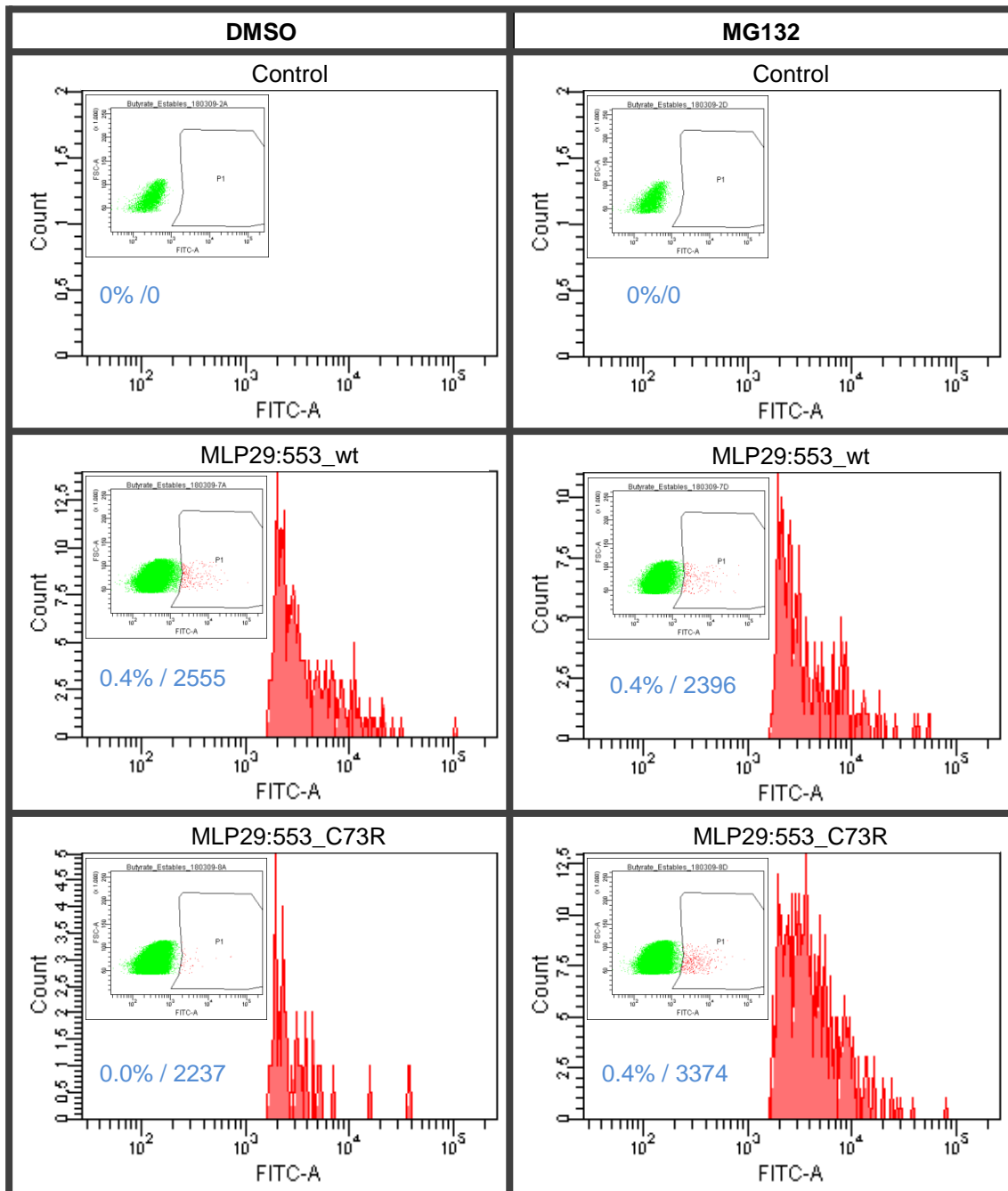


Figura IV.43. Resultats del tractament amb MG132 de les cèl·lules MLP29 (control), MLP29:607_wt i MLP29:607_C73R analitzats per citometria de flux. En les gràfiques secundàries (verd) s'observen els resultats de fluorescència i mida de la població de cèl·lules de cada mostra. Les cèl·lules positives per fluorescència de l'EGFP (senyal FITC-A) es representen en les gràfiques principals (vermell). En blau es resumeixen el nombre de cèl·lules en cada tractament, així com el nombre el percentatge de cèl·lules que han donat positiu per fluorescència de l'EGFP.

El tractament de les cèl·lules MLP29 amb l'inhibidor del proteasoma MG132 ha donat bon resultat en el cas de les construccions U3S-EGFP (553wt i 553C73R). Tal i com s'observa en la Figura IV.43, la presència del compost MG132 no sembla afectar la població que expressa i manté la proteïna U3S unida a EGFP, ja que la proporció de cèl·lules positives en el tractament amb DMSO (el solvent de l'inhibidor del proteasoma) i en el tractament amb MG132 no varia. Per altra banda, en el cas de la proteïna mutant U3S-C73R, s'observa com sense l'inhibidor del proteasoma no s'obté senyal de l'EGFP, i per tant, les mostres no contenen la proteïna mutant en el moment de l'anàlisi. En canvi, en incubar les mostres de MLP29:553_C73R en presència del MG132, el percentatge de població que conté la proteïna mutant U3S-C73R_EGFP augmenta fins a assolir el mateix valor que en el cas de la proteïna salvatge.

Així doncs, tant amb els resultats obtinguts de l'anàlisi dels extractes proteics, com amb els obtinguts de les cèl·lules fixades i analitzades per citometria de flux, s'observa cap a una millora de la concentració de la proteïna U3S en l'interior cel·lular quan els cultius són tractats en presència de l'inhibidor del proteasoma MG132, la qual cosa apunta que la ruta de degradació de la U3S té lloc via proteasoma, i obre les portes cap a futures investigacions amb el MG132 com a possible candidat terapèutic en el tractament de la porfíria eritropoietica congènita.

Bibliografia Capítol IV

- ¹ Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R.*, Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G. *ClustalW and ClustalX version 2*. *Bioinformatics* 23, 21: 2947-2948 (2007).
- ² Namba,H., Narahara,K., Tsuji,K., Yokoyama,Y. and Seino,Y. *Assignment of human porphobilinogen deaminase to 11q24.1----q24.2 by in situ hybridization and gene dosage studies*. *Cytogenet. Cell Genet.* 57 (2-3):105-108 (1991).
- ³ <http://www.beckmancoulter.com/literature/Bioresearch/390003AE.pdf> (250110)
- ⁴ Studier F. W.; Moffatt B. A. *Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes*. *J. Mol. Biol.* 189, 1:113-130 (1986).
- ⁵ Shoolingin-Jordan P. M.; Al-Dbass A.; McNeill L. A.; Sarwar M.; Butler D. *Human porphobilinogen deaminase mutations in the investigation of the mechanism of dipyrromethane cofactor assembly and tetrapyrrole formation*. *Biochem. Soc. trans.* 31, 3:731-735 (2003).
- ⁶ Palmer, A. G. *NMR characterization of the dynamics of biomacromolecules*. *Chem. Rev.*, 104, 8:3623-3640 (2004).
- ⁷ Gerstein M.; Lesk A. M.; Chothia C. *Structural mechanisms for domain movements in proteins*. *Biochemistry*, 33, 22:6739-6749 (1994).
- ⁸ Eisenmesser E. Z.; Millet O.; Labeikovsky W.; Korzhnev D. M.; Wolf-Watz M.; Bosco D. A.; Skalicky J. J.; Kay L. E.; Kern D. *Intrinsic dynamics of an enzyme underlies catalysis*. *Nature*, 438, 7064:117-121 (2005).
- ⁹ Golovanov A. P.; Hautbergue G. M.; Wilson S. A.; Lian L-Y. *A simple method for improving protein solubility and long-term stability*. *JACS*, 126:8933-8939 (2004).
- ¹⁰ 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 (2008).
- ¹¹ Becktel, W. J. and Schellman, J. A. *Protein stability curves*. *Biopolymers* 26, 1859-1877 (1987).
- ¹² Santoro, M. M., and Bolen, D. W. *Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl alpha-chymotrypsin using different denaturants*. *Biochemistry* 27, 8063-8068 (1988).
- ¹³ Dill K. A. *Domain forces in protein folding*. *Biochemistry*, 29, 31:7133-7155 (1990).
- ¹⁴ Jackson S. E., Fersht A. R. *Folding of Chymotrypsin Inhibitor 2. Evidence for a Two-State Transition*. *Biochemistry* 30, 10428-10435 (1991).
- ¹⁵ Plaza del Pino, I. M., Ibarra-Molero, B., and Sanchez-Ruiz, J. M. *Lower kinetic limit to protein thermal stability: a proposal regarding protein stability in vivo and its relation with misfolding diseases*. *Proteins* 40, 58-70 (2000).

- ¹⁶ Galisteo, M. L., Mateo, P. L., and Sanchez-Ruiz, J. M. *Kinetic study on the irreversible thermal denaturation of yeast phosphoglycerate kinase*. *Biochemistry* 30, 2061-2066 (1991).
- ¹⁷ Baker, D., and Agard, D. A. *Kinetics versus thermodynamics in protein folding*. *Biochemistry* 33, 7505-7509 (1994).
- ¹⁸ Duy, C., and Fitter, J. *Thermostability of irreversible unfolding alpha-amylases analyzed by unfolding kinetics*. *J. Biol. Chem.* 280, 37360–37365 (2005).
- ¹⁹ Sanchez-Ruiz, J. M., Lopez-Lacomba, J. L., Cortijo, M., and Mateo, P. L. *Differential scanning calorimetry of the irreversible thermal denaturation of thermolysin*. *Biochemistry* 27, 1648–1652 (1988).
- ²⁰ Tello-Solis, S. R., and Hernandez-Arana, A. *Effect of irreversibility on the thermodynamic characterization of the thermal denaturation of Aspergillus saitoi acid proteinase*. *Biochem. J.* 311, 969–974 (1995).
- ²¹ 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).
- ²² Boulechfar S., Da Silva V., Deybach J-C., Nordmann Y., Grandchamp B., de Verneuil H. *Heterogeneity of mutations in the uroporphyrinogen III synthase gene in congenital erythropoietic porphyria*. *Hum. Genet.* 88:320-324 (1992).
- ²³ Shoolingin-Jordan, P. M., and Leadbeater, R. *Coupled assay for uroporphyrinogen III synthase*. *Methods Enzymol.* 281, 327–336 (1997).
- ²⁴ Tsai, S. F., Bishop, D. F., and 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).
- ²⁵ Hart, G. J., and Battersby, A. R. *Purification and properties of uroporphyrinogen III synthase (co-synthetase) from Euglena gracilis*. *Biochem. J.* 232, 151–160 (1985).
- ²⁶ Boulechfar S., Silva V., Deybach JC., Nodmann Y., Grandchamp B., Verneuil H. *Heterogeneity of mutations in the uroporphyrinogen III synthase gene in congenital erythropoietic porphyria*. *Hum. Genet.* 88:320-324 (1992).
- ²⁷ Drazic M., Delic V. *Mutagenic Action of N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitroso-guanidine on Gaffkya tibisci at Alkaline pH*. *J. Bacteriol.* 104, 1:585-587 (1970).
- ²⁸ Ames N. B., Lee F. D., Durston W. E. *An Improved Bacterial Test System for the Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70, 3:782-786 (1973).
- ²⁹ Smith M. *Nobel Lectures, Chemistry 1991-1995*, Editor Bo G. Malmström, World Scientific Publishing Co., Singapore, (1997).

- ³⁰ Kunkel T.A. Roberts J.; Zakour R. A. *Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection*. *Methods Enzymol.* 154:367-382 (1987).
- ³¹ Manual QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit #200518 (Revision B.01).
- ³² 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).
- ³³ 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).
- ³⁴ 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).
- ³⁵ MOLMOL 2K.2, versió de Reto Koradi (1999-2003) del programa original (MOLMOL versió 2.1-2.6: Copyright (c) 1994-98 de l'Institut de Biologia Molecular i Biofísica ETH de Zurich, Spectrospin AG, Faellanden, Switzerland). Dispositiu gràfic OpenGL.
- ³⁶ Desnick, R. J., and Astrin, K. H. *Congenital erythropoietic porphyria: advances in pathogenesis and treatment*. *Br. J. Haematol* 117, 779–795 (2002).
- ³⁷ Frank, J., Wang, X., Lam, H. M., Aita, V. M., Jugert, F. K., Goerz, G., Merk, H. F., Poh-Fitzpatrick, M. B., and Christiano, A. M. *C73R is a hotspot mutation in the uroporphyrinogen III synthase gene in congenital erythropoietic porphyria*. *Ann. Hum. Genet.* 62, 225–230 (1988)..
- ³⁸ Mathews M. A. A.; Schubert H. L.; Whitby F. G.; Alexander K. J.; Schadick K.; Bergonia H. A.; Phillips J. D.; Hill C. P. *Crystal structure of human uroporphyrinogen III synthase*. *The EMBO Journal*, 20, 21:5832–5839 (2001).
- ³⁹ 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).
- ⁴⁰ Desnick R. J., Glass I. A., Xu W., Solis C., Astrin K. H. *Molecular genetics of congenital erythropoietic porphyria*. *Semin. Liver. Dis.* 18, 77-84 (1998).
- ⁴¹ Bar-Nun S., Shneyour Y., Beckmann J. S. *G-418, an elongation inhibitor of 80 S ribosomes*. *Biochim Biophys Acta.* 741, 1:123-127 (1983).
- ⁴² Livak K. J., Schmittgen T.D. *Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method*. *Methods* 25, 402-408 (2001).
- ⁴³ Wu A., Hunt C., Morimoto R. *Structure and Expression of the Human Gene Encoding Major Heat Shock Protein HSP70*. *Molecular and Cellular Biology* 5, 2:330-341 (1985).

- ⁴⁴ Tavaría M., Gabriele T., Kola I., Anderson R. L. *A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family*. Cell Stress & Chaperones 1, 1:23-28 (1996).
- ⁴⁵ Schlesinger M. J. *Heat-shock proteins*. J. Biol. Chem. 265, 21:1211–12114 (1990).
- ⁴⁶ McCaffery J. M., Farquhar M. G. *Localization of GTPases by indirect immunofluorescence and immunoelectron microscopy*. Methods in enzymology 257, 259-279 (1995).
- ⁴⁷ Ellis R. J., van der Vies S. M. *Molecular chaperones*. Ann. Rev. Biochem. 60, 321-347 (1991).
- ⁴⁸ Kim S-H., Yan Y-B, Zhou H-M. *Role of osmolytes as chemical chaperones during the refolding of aminoacylase*. Biochem. Cell Biol. 84, 1:30-38 (2006).
- ⁴⁹ Yam G. H-F., Gaplovska-Kysela K., Zuber C., Roth J. *Sodium 4-Phenylbutyrate Acts as a Chemical Chaperone on Misfolded Myocilin to Rescue Cells from Endoplasmatic Reticulum Stress and Apoptosis*. Invest. Ophthal. Visual. Science 48; 1683-1690 (2007).
- ⁵⁰ Cavaliere V., Papademetrio D. L., Lorenzetti M., Valva P., Preciado M. V., Gargallo P., Larripa I., Monreal M. B., Pardo M. L., Hajos S. E., Blanco G. A. C., Álvarez E. M. C. *Caffeic Acid Phenylethyl Ester and MG-132 Have Apoptotic and Antiproliferative Effects on Leukemic Cells But Not on Normal Mononuclear Cells*. Transl. Oncol. 2, 1:46–58 (2009).
- ⁵¹ Andela V. B., Rosier R. N. *The proteasome inhibitor MG132 attenuates Retinoic Acid Receptor trans-activation and enhances trans-repression of Nuclear Factor κ B. Potential relevance to chemo-preventive interventions with retinoids*. Molecular Cancer, 3, 1-12 (2004).
- ⁵² Lee D. H., Goldberg A. L. *Proteasome inhibitors cause induction of heat shock proteins and trehalose, which together confer thermotolerance in Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 18, 1:30-8 (1998).