

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.

V. Conclusions

- V.1.** S'ha obtingut el gen de l'enzim PBGD humà, s'ha clonat i expressat en *E. coli*. S'ha establert un protocol de purificació per les proteïnes PBGD i U3S humanes que ha permès obtenir mostres concentrades i estables al llarg del temps.
- V.2.** Les proteïnes PBGD i U3S no interaccionen en les condicions *in vitro* estudiades, tal i com demostren els experiments de pertorbació del desplaçament químic realitzats.
- V.3.** S'ha determinat que l'enzim U3S és una proteïna que es desplega irreversiblement, obeint a un model d'estabilitat cinètica. Els experiments de desplegament s'ajusten bé a un model de tres estats (proteïna nativa, proteïna desplegada i estat agregat). A temperatura fisiològica, la proteïna U3S té un temps de vida mitja de 61.1 h, i la seva energia d'activació (E_a) correspon a 101.5 kcal.mol⁻¹.
- V.4.** S'han clonat 25 proteïnes variants de la U3S corresponent a mutants patogènics en humans, de les quals se n'han expressat i purificat 24. D'aquestes 24, se n'ha determinat l'estabilitat cinètica i l'activitat enzimàtica, podent agrupar-les en quatre grans grups segons el grau d'estabilitat i valors d'activitat relativa, que concorden amb la seva patogenicitat. Els mutants associats a un fenotip més sever de PEC són els que presenten una baixa estabilitat, o una activitat catalítica molt alterada per la mutació.
- V.5.** Experiments de RMN han permès determinar que com a mínim 3 dels 24 mutants patogènics de la U3S presenten una conformació tridimensional diferent de la de la proteïna salvatge. Aquestes tres mutacions estan associades a fenotips severs de PEC.
- V.6.** La tercera hèlix alfa de la proteïna U3S s'ha identificat com un punt clau en l'estabilitat cinètica de l'enzim. La mutació C73R, present en un terç dels pacients amb PEC, es troba localitzada en aquesta hèlix alfa.
- V.7.** Els dobles mutants U3S-C73R/E71Q, U3S-C73R/E71K i U3S-C73R/E75Q tenen un terç de l'activitat sintasa respecte la proteïna U3S salvatge, i no reverteixen l'efecte de la mutació C73R.
- V.8.** Els estudis de l'expressió de la proteïna mutant U3S-C73R en cèl·lules M1 indiquen que, en les condicions experimentals assajades, aquest enzim mutant s'expressa, però els resultats d'immunotransferència demostren algun tipus d'anomalia a nivell proteic.

- V.9.** Els experiments demostren que la proteïna U3S és un enzim citoplasmàtic mentre que la proteïna mutant U3S-C73R presenta un patró de dispersió cel·lular diferent, formant aglomeracions citoplasmàtiques.
- V.10.** Un tractament amb 0.5% de glicerol sembla que afavoreix la concentració de la proteïna U3S intracel·lular, mentre que el 5% resulta tòxic per les cèl·lules.
- V.11.** S'ha descobert que l'inhibidor del proteasoma MG132 afavoreix l'augment de la proteïna mutant U3S-C73R en les cèl·lules, obrint una nova línia potencial d'intervenció terapèutica.