



Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana
ISSN: 0325-2957
ISSN: 1851-6114
actabioq@fbpba.org.ar
Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos
Aires
Argentina

Relación estructura-función de la enzima uroporfirinógeno descarboxilasa: implicancias para la comprensión y el tratamiento de la porfiria cutánea tarda

 **Graziano, Martín**
 **Carcagno, Abel Luis**
 **Romero, Delfina Mercedes**
 **Ríos de Molina, María del Carmen**

Relación estructura-función de la enzima uroporfirinógeno descarboxilasa: implicancias para la comprensión y el tratamiento de la porfiria cutánea tarda
Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, vol. 57, núm. 1, pp. 3-15, 2023
Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires
Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=53575343002>

BIOQUÍMICA CLÍNICA
Relación estructura-función de la enzima
uroporfirinógeno descarboxilasa:
implicancias para la comprensión y el
tratamiento de la porfiria cutánea tarda

*Structure-function relationship of the enzyme uroporphyrinogen
decarboxylase: implications for the understanding and treatment of
porphyria cutanea tarda*

*Relação estrutura-função da enzima uroporfirinogênio descarboxilase:
implicações para a compreensão e tratamento da porfiria cutânea
tardia*

Reconocimiento a la trayectoria del Prof. Dr. Juan Miguel Castagnino†

Martín Graziano 1

*Departamento de Ecología Genética y Evolución, Facultad de
Ciencias Exactas y Naturales, CONICET-UBA, Instituto de
Ecología, Genética y Evolución de Buenos Aires (IEGEBA),
Argentina*

 <https://orcid.org/0000-0002-6876-7211>

Abel Luis Carcagno 1

*Departamento de Ecología Genética y Evolución, Facultad de
Ciencias Exactas y Naturales, CONICET-UBA, Instituto de
Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y
Naturales (IQUIBICEN), Argentina*

 <https://orcid.org/0000-0001-9094-4926>

Delfina Mercedes Romero 1

*Facultad de Medicina, CONICET-UBA, Instituto de Biología
Celular y Neurociencias "Prof. E. De Robertis" (IBCN),
Argentina*

 <https://orcid.org/0000-0002-6602-1889>

María del Carmen Ríos de Molina 2

*Departamento de Química Biológica, FCENUBA. CONICET-
UBA, Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias
Exactas y Naturales (IQUIBICEN), Argentina*

madelcrios@gmail.com

 <https://orcid.org/0000-0002-6047-3585>

Resumen: La uroporfirinógeno descarboxilasa humana (UROD-h) es la quinta enzima del camino biosintético del hemo y su actividad deficiente, relacionada a mutaciones en su gen, se encuentra asociada a un subgrupo de porfirias. El objetivo de este trabajo fue estudiar la relación entre la dimerización de la enzima y su actividad enzimática y comprobar si la dimerización de UROD-h es imprescindible tanto para la primera etapa de la reacción (urogen→heptagen), como para la segunda etapa (heptagen→coprogen). Con ese objetivo, se expresó y purificó la UROD-h hasta homogeneidad, se analizó el comportamiento dímero-monómero bajo

Acta Bioquímica Clínica
Latinoamericana, vol. 57, núm. 1, pp.
3-15, 2023

Federación Bioquímica de la Provincia
de Buenos Aires

Recepción: 30 Mayo 2022
Aprobación: 23 Febrero 2023

distintas condiciones que pudieran desplazar el equilibrio de dimerización y se evaluó la actividad enzimática en dichas condiciones. Los resultados obtenidos sugieren que la especie activa para la primera etapa de la reacción es el homodímero y que tanto el dímero como el monómero se comportan como especies activas para la segunda etapa de la reacción. Se propone que mutaciones clínicas como la Y311C, existentes en pacientes con porfiria cutánea tarda, podrían afectar la estabilidad del dímero y podrían ser el blanco para futuras terapias génicas.

Palabras clave: Uroporfirinógeno descarboxilasa, Equilibrio de dimerización, Uroporfirinógeno, Pentaporfirinógeno, Purificación enzimática, Mecanismos de reacción, Porfiria cutánea tarda, Mutaciones.

Abstract: *Human uroporphyrinogen decarboxylase (UROD-h) is the fifth enzyme in the heme biosynthetic pathway and its deficient activity, related to mutations in its gene, is associated with a subset of porphyrias. The objective of this work was to study the relationship between the dimerisation of the enzyme and its enzymatic activity and to verify if the dimerisation of UROD-h is essential both for the first stage of the reaction (urogen→heptagen), and for the second stage (heptagen→coprogen). With this objective, the UROD-h was expressed and purified to homogeneity, the dimer- monomer behaviour was analysed under different conditions, which could shift the dimerisation equilibrium, and the enzymatic activity was evaluated under these conditions. The results obtained suggest that the active species for the first stage of the reaction is the homodimer, and both the dimer and the monomer behaved as active species for the second stage of the reaction. It is proposed that clinical mutations such as Y311C, existing in porphyria cutanea tarda patients, could affect dimer stability and could be the target of future gene therapies.*

Keywords: Uroporphyrinogen decarboxylase, Dimerization equilibrium, Uroporphyrinogen, Pentaporphyrinogen, Enzymatic purification, Reaction mechanisms, Porphyria cutanea tarda, Mutations.

Resumo: *A enzima uroporfirinogênio descarboxilase humana (UROD-h) é a quinta enzima da via biossintética do heme e sua atividade deficiente, relacionada com mutações em seu gene, está associada a um subgrupo de porfirias. O objetivo deste trabalho foi estudar a relação entre a dimerização da enzima e sua atividade enzimática e comprovar se a dimerização da UROD-h é imprescindível tanto para a primeira etapa da reação (urogênio→heptagênio), quanto para a segunda etapa (heptagênio→coprogênio). Com esse objetivo, a UROD-h foi expressa e purificada até a homogeneidade, o comportamento de dímero-monômero foi analisado sob diversas condições, que puderam deslocar o equilíbrio de dimerização, e a atividade enzimática foi avaliada em tais condições. Os resultados obtidos sugerem que a espécie ativa para a primeira etapa da reação é o homodímero, e tanto o dímero quanto o monômero se comportam como espécies ativas para a segunda etapa da reação. Propõe-se que mutações clínicas como Y311C, existentes em pacientes com porfiria cutânea tardia, poderiam afetar a estabilidade do dímero e poderiam ser o alvo de futuras terapias gênicas em porfiria cutânea tardia.*

Palavras-chave: Uroporfirinogênio descarboxilase, Equilíbrio de dimerização, Uroporfirinogênio, Pentaporfirinogênio, Purificação enzimática, Mecanismos de reação, Porfiria cutânea tardia, Mutações.

Introducción

La uroporfirinógeno descarboxilasa (UROD, EC 4.1.37) es la quinta enzima del camino biosintético del hemo. La enzima actúa primero protonando los cuatro anillos pirrólicos que forman su sustrato, el uroporfirinógeno (urogen), el cual posee ocho carboxilos expuestos. Este primer paso permite la posterior descarboxilación de cuatro de esas cadenas laterales, que son grupos acetato, hasta llegar al producto final, el coproporfirinógeno (coprogen) de cuatro carboxilos, pasando secuencialmente por intermediarios de siete, seis y cinco carboxilos (1) (2) (3) (4). Se han identificado dos enfermedades en las que los pacientes presentan actividad subnormal de esta enzima: la porfiria cutánea tarda (PCT) y la porfiria hepatoeritropoyética (siglas en inglés: HEP) (5), asociadas a mutaciones en el gen de la UROD.

La UROD humana (UROD-h) contiene 367 aminoácidos y su peso molecular (PM) teórico es de 40,83 kDa (6). En electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) la enzima purificada de eritrocitos presenta un peso molecular aparente de 39,5-41,0 kDa y su determinación, por cromatografía de filtración molecular, da un valor promedio de 58,0 kDa (rango 51-66 kDa) (1) (2). Por su parte, Phillips *et al.* (7) han demostrado, empleando columnas de tamizaje molecular y técnicas de dispersión dinámica de luz (DLS), que la UROD-h recombinante se encuentra en solución como un homodímero, con una constante de disociación (K_d) de aproximadamente 0,1 μ M. Posteriormente, propusieron un papel crítico de la interfaz de dimerización, ya que no pudieron obtener mutantes que tendieran a romper la estructura dimérica (8). El análisis de la estructura terciaria y la localización de mutaciones clínicamente relevantes en la UROD, les permitió, a su vez, comprobar que algunas de esas mutaciones se sitúan en la interfaz de dimerización y propusieron que la actividad subnormal se debería a la interrupción de esta interfaz. Por otra parte, Whitby *et al.* (9) habían demostrado que la mutación Y311C, encontrada en pacientes con PCT y HEP, se localizaba en la interfaz de dimerización. La disminución de la actividad enzimática, en sangre hemolizada de pacientes con esta mutación, fue de alrededor del 30% para pacientes heterocigotos y del 86% para homocigotos (10). La actividad específica (AE) de la UROD-Y311C recombinante es un 58% más baja que la de UROD wt (11) (12) (13).

El mecanismo de reacción de esta enzima no se conoce con exactitud, pero se han propuesto varias hipótesis, donde la dimerización podría jugar un papel importante (10) (14). Si bien, en condiciones fisiológicas, la reacción ocurre de manera secuencial, comenzando por un acetilo en el anillo D y procediendo en el sentido de las agujas del reloj (D, A, B y C) (15), a altas concentraciones de sustrato, la descarboxilación empieza en cualquier pirrol y continúa al azar por los restantes (16) (17). Por su parte, de Verneuil *et al.* (1) demostraron, en hemolizados de sangre humana libres de

hemoglobina, que la UROD-h presenta una inhibición competitiva recíproca entre isómeros de diferentes series, por ejemplo urogen III y urogen I, y una inhibición competitiva no recíproca entre porfirinógenos de la misma serie, por ejemplo heptacarboxiporfirinógeno III (heptagen III) y urogen III, pero no hubo inhibición en la dirección inversa. En ese sentido, Akhtar (18) ha propuesto que la protonación del anillo pirrólico por un residuo ácido sería capaz de actuar como un sumidero de electrones, permitiendo que ocurra la primera descarboxilación. Una segunda protonación del anillo pirrólico, seguida del retorno del primer protón al residuo ácido, rendiría el producto de cada paso.

La UROD es una descarboxilasa especial, que cataliza la reacción sin intervención de cofactores, necesarios para la mayoría de las descarboxilasas. Martins *et al.* (19) han propuesto que el mecanismo de acción comenzaría con la protonación del sustrato por un residuo arginina y describieron la primera estructura cristalina de la UROD de *Nicotiana tabacum*, junto con un modelado molecular de la unión del sustrato, tanto en la enzima vegetal como en la humana. La comparación estructural, entre las proteínas homólogas de estas dos fuentes, revela un centro catalítico similar, hendido con seis residuos polares invariantes. Los análisis estructurales y el modelado de ambas enzimas permitieron proponer un mecanismo catalítico común, entre la enzima de tabaco y la humana. Asp82 y Tyr159 parecen ser los grupos funcionales catalíticos, mientras que los otros residuos servirían en el reconocimiento y en la unión del sustrato con la Arg32.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la relación entre la dimerización de la enzima y su actividad enzimática y comprobar si la dimerización de UROD-h es imprescindible, tanto para la primera etapa de la reacción (urogen→heptagen) como para la segunda etapa (heptagen→coprogen). Con ese objetivo, se expresó y purificó a homogeneidad la UROD-h, se analizó el comportamiento dímero-monómero bajo distintas condiciones que pudieran desplazar el equilibrio de dimerización y se evaluó la actividad enzimática en dichas condiciones. Los resultados obtenidos sugieren que la especie activa para la primera etapa de la reacción es el homodímero y, tanto el dímero como el monómero, se comportan como especies activas para la segunda etapa de la reacción. Finalmente, se analizaron las implicancias de estos resultados para la comprensión del mecanismo de reacción de la UROD y su relación con enfermedades humanas tales como la PCT y la HEP.

Materiales y Métodos

Reactivos

Las enzimas de restricción Hind III y Bgl II fueron de marca Gibco BRL. El *kit* Wizard SV Gel, el *kit* PCR Preps y la T4 DNA ligasa fueron de marca Promega. El *kit* S.N.A.P. y el Ni²⁺-NTA fueron de marca Invitrogen. Los concentradores Centriprep fueron de marca

Amicon. La columna Superdex 75 y los estándares de peso molecular fueron de marca Sigma-Aldrich, al igual que los restantes reactivos.

Subclonado, expresión y purificación de la UROD-h

La amplificación de la UROD-h por PCR se realizó utilizando como molde el cADN de la UROD-h en el plásmido pBluescript (amablemente cedido por la Dra. San Martín de Viale). Los productos amplificados por PCR y el vector de expresión pRSET A se digirieron con las enzimas de restricción Hind III y Bgl II durante 2 h a 37 °C. Los productos se purificaron utilizando el *kit* Wizard SV Gel y PCR Preps y se cuantificaron por electroforesis en gel de agarosa, utilizando como estándar el marcador Φ 174. Una vez digeridos, se ligaron con T4 DNA ligasa, toda la noche (ON) a 16 °C. Luego se transformaron bacterias *E. coli* Nova Blue, previamente competentes, mediante el método de CaCl₂. Las bacterias se almacenaron a -70 °C hasta su posterior uso. La transformación se realizó por *shock* térmico a 42 °C por 2 min. Las bacterias se enfriaron, se adicionaron 800 μ L de medio de cultivo Luria-Bertani (LB) y se incubaron a 37 °C con agitación por 1 h. Luego se incubaron ON a 37 °C en placas LB con ampicilina. Posteriormente se realizó el proceso de selección de las colonias, haciendo extracciones del ADN plasmídico, utilizando el *kit* S.N.A.P. A partir de las colonias positivas, se secuenció un clon para confirmar la secuencia completa del cADN.

Para la expresión de la UROD-h, un cultivo de 1L de *E. coli* pRSET-UROD se dejó crecer hasta una OD₆₀₀ de 0,5 en medio de cultivo LB y luego se indujo con isopropiltiogalactósido (IPTG) 1 mM por 5 h. Las células se resuspendieron en tampón fosfato de potasio 0,134 M, pH 6,8 y se sonicaron con 5 pulsos de 15 s (Fisher Sonic Dismembrator Modelo 300), se centrifugaron a 10 000 x g por 30 min, se separó el sobrenadante y se agregaron los inhibidores de proteasas fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, del inglés: *phenylmethylsulfonyl fluoride*) y benzamidina a las concentraciones finales de 0,5 M y 0,2 M respectivamente. Los sobrenadantes se almacenaron a -20 °C hasta la posterior extracción y purificación de la UROD-h.

El extracto de proteínas se sembró en una columna de 1 mL de Ni²⁺-NTA, que se acopló a un sistema de FPLC (Pharmacia) con detector de absorbancia. Brevemente, la columna equilibrada con el tampón fosfato de potasio pH 6,8 (300 mM NaCl, 50 mM K₃PO₄, 10% glicerol, 1 mM β -mercaptoetanol), se sembró con el extracto proteico. La elución se realizó con un gradiente continuo en cuatro etapas: a) tampón con 0-100 mM de imidazol, 2) tampón con 100-125 mM de imidazol, 3) tampón con 100-250 mM de imidazol, 4) tampón con 250 mM de imidazol. Bajo este protocolo se obtuvieron dos picos con actividad enzimática. Las fracciones que salían en la zona con actividad UROD se reunieron y concentraron, utilizando concentradores Centriprep y centrifugando a 3500 x g por 30-60 min. De ser necesario, según la purificación observada por SDS-PAGE al 12%, se procedió a un segundo paso de purificación

por filtración molecular, en una columna de Superdex 75 equilibrada y eluida con tampón fosfato de potasio 0,134 M, pH 6,8. En todos los casos, el perfil cromatográfico se obtuvo midiendo la absorbancia de los eluidos a 280 nm.

Cuantificación de proteínas

La cuantificación de las proteínas, durante el proceso de purificación, se realizó por el método de Bradford (20), utilizando albúmina de suero bovino 0,1 mg/mL como solución estándar para realizar la curva de calibración. Una vez obtenida la UROD-h purificada hasta homogeneidad, se cuantificó su concentración por medición de la absorbancia a 280 nm y utilización del coeficiente de extinción molar $\epsilon=50$ mM, obtenido por de Verneuil *et al.* (21) para la UROD-h. A este valor se le agregó la contribución de una tirosina y de un triptófano presente en el extremo N-terminal del péptido fusionado a la UROD, a través de la ecuación $\epsilon=5,5 \text{ N}^\circ \text{ Trp} + 1,49 \text{ N}^\circ \text{ Tyr} + 0,125 \text{ N}^\circ \text{ Cys}$. El valor de ϵ utilizado fue 57 mM^{-1} . Las mediciones se hicieron por duplicado, con un error estimado del 5%.

Determinación estándar de la actividad UROD-h

Se midió la actividad UROD-h usando como sustrato urogen III o pentagen I, según el caso. Se utilizó pentagen I en lugar de pentagen III debido a la imposibilidad de obtener este sustrato en forma comercial. Las soluciones de porfirinógeno se prepararon por reducción de la correspondiente porfirina con amalgama de sodio, en total oscuridad, ajustada a pH 6,8 (urogen III) o pH 6,0 (pentagen I) y usadas inmediatamente para evitar la oxidación del sustrato (22). El medio de incubación estuvo compuesto de tampón fosfato de potasio 0,067 M, pH 6,8 para el urogen III o pH 6,0 para el pentagen I, GSH 1 mM, EDTA 0,1 mM, y una cantidad variable tanto de sustrato como de la muestra enzimática, según el ensayo, en un volumen final de 1 mL. La muestra de UROD-h se preincubó durante 90 min en todos los casos. La incubación fue realizada en anaerobiosis, por un tiempo variable según el ensayo (5-15 min), a 37 °C, en total oscuridad. Finalizada la incubación, se destaparon los tubos, para permitir la entrada de aire y la oxidación de los porfirinógenos, se colocaron en hielo y se adicionó, en cada uno, HCl concentrado c.s.p. 5%. Los tubos se mantuvieron en hielo, por 30 min, bajo luz ambiental y el contenido se filtró por papel Whatman. Los productos de la reacción fueron separados y cuantificados como porfirinas libres, por HPLC, con una columna μ -Bondapack C-18 (23). La descarboxilación del urogen III fue medida como la suma (hepta + hexa + penta + copro) porfirinas formadas y la del pentagen I como la formación de coproporfirina I (24). En todos los casos, el porcentaje de descarboxilación obtenido osciló entre 2 y 30%, según la concentración de proteína utilizada. Una unidad enzimática (UE) se definió como la cantidad de enzima que descarboxila 1 nmol de sustrato por minuto. La actividad específica (AE) se calculó como

UE/ μg UROD utilizada en el ensayo. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

Para la determinación de K_m , tanto con urogen III o con pentagen I, se utilizó una cantidad variable de sustrato (2,3-23 μM para urogen III; 0,15-17 μM para pentagen I), con un tiempo de incubación a 37 °C de 15 min para urogen III y entre 5 y 15 min para pentagen I, según la concentración de sustrato utilizada. En ambos casos se utilizó 1 μg de proteína. Debido a que algunos datos presentaban una transformación de sustrato cercana al 10%, fueron corregidos por el método de Lee y Wilson (25). Luego, los datos fueron linealizados para su representación por el método de Hanes-Woolf (linealización necesaria cuando los mismos no están distribuidos homogéneamente). Se aplicaron métodos de regresión lineal para obtener el K_m y la V_{max} en cada caso.

Efecto de la concentración de UROD-h y KCl sobre la actividad enzimática

Para los ensayos de actividad en función de la concentración de proteína, en el caso de urogen III, se utilizaron entre 0,1 y 5,0 μg (UROD 0,002-0,110 μM), y para pentagen I entre 0,3 y 7,0 μg (UROD 0,007-0,110 μM). Los ensayos se realizaron a saturación de sustrato, con una concentración final de 14 μM en los ensayos con urogen III y de 10 μM para pentagen I. El resto del procedimiento siguió el método anteriormente descripto.

Para la evaluación del efecto de distintas concentraciones de KCl sobre la actividad enzimática, se siguieron las indicaciones descriptas anteriormente, en dos condiciones distintas: en un ensayo se preincubó la enzima, se equilibró y se eluyó cada columna y se determinó la actividad enzimática en el tampón fosfato de potasio 0,134 M (pH 6,8), que contenía distintas concentraciones de KCl, en el rango 0 y 0,4 M. En el otro ensayo, la enzima se preincubó y se eluyó la columna en tampón sin KCl, pero la actividad enzimática se midió en presencia de las mismas concentraciones de KCl empleadas en los experimentos anteriores. Se utilizó la diferencia de AE entre ensayos, a una misma concentración de KCl, para descontar el efecto del KCl sobre la actividad catalítica *per se* y obtener la actividad relacionada con diferencias en el grado de dimerización. Los ensayos se realizaron por duplicado.

Ensayos de filtración molecular

Los ensayos de filtración molecular se realizaron utilizando una columna Superdex 75, de 10 mm de diámetro interno y 30 cm de largo, acoplada al sistema de FPLC, con detector de absorbancia. Todas las corridas se realizaron, salvo que se indique lo contrario, preincubando el ensayo y eluyendo la columna con tampón fosfato de potasio 0,134 M, pH 6,8, a temperatura ambiente (20-25 °C), a una velocidad de flujo de 1 mL/min y monitoreando la absorbancia a 280 nm. Las muestras se preincubaron a 4 °C, toda la noche, antes de su pasaje por la columna. Se realizó una curva de calibración utilizando

los siguientes estándares de PM: albúmina de suero bovino (66 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), citocromo c (12,4 kDa) y aprotinina (6,5 kDa). Los datos de volumen de elución se relativizaron con el volumen muerto (V_0), medido con Blue Dextran (PM aprox. 2 kDa) y se calculó el PM aparente de la UROD-h en los distintos ensayos realizados.

Para la evaluación del efecto de distintas concentraciones de UROD-h sobre el volumen de elución se sembraron, en la columna de filtración molecular, entre 50 y 125 μg de UROD-h a distintas concentraciones (0,1-2 mg/mL) en tampón fosfato de potasio 0,134 M, ditiotreitól (DTT) 1 mM, glicerol 10%. Se promediaron los datos obtenidos, en dos o tres determinaciones independientes, para cada concentración ensayada.

Para la evaluación del equilibrio dímero-monómero, bajo distintas concentraciones de UROD-h, se incubó la proteína en un rango de concentraciones desde 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (0,22 μM) hasta 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (22,2 μM), en tampón fosfato 0,067 M y DTT 1 mM.

En el caso de la evaluación del efecto del sustrato urogen III reducido y su forma oxidada (uroporfirina III) se sembraron, en las condiciones estándar, UROD-h 0,125 mg/mL, que contenía glicerol al 20% y DTT 2 mM. Se utilizaron dos concentraciones del sustrato reducido (3 y 30 μM) y una concentración del sustrato oxidado (30 μM). Los ensayos con el sustrato reducido se realizaron en oscuridad, previa reducción del sustrato con amalgama de sodio y mantenido en oscuridad hasta su uso. La elución se realizó con el mismo tampón de siembra (fosfato de potasio 0,067 M, pH 6,8).

Para la evaluación del efecto de distintas concentraciones de KCl sobre el perfil de elución de la UROD-h, se sembraron 125 μg de UROD-h de una solución de 0,5 mg/mL, en tampón fosfato de potasio 0,067 M, DTT 2 mM, glicerol 20%. Se ensayaron concentraciones de KCl entre 0 y 0,4 M. Las corridas se hicieron, como en los demás casos, preequilibrando la columna y haciendo la elución con la misma concentración de KCl que el tratamiento.

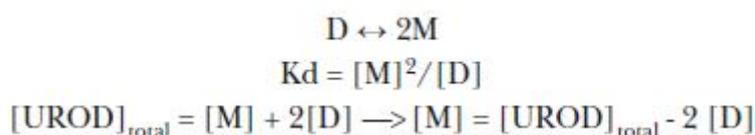
Entrecruzamiento o *cross-linking*

Para la evaluación del equilibrio reversible dímeromonómero de la UROD-h, el protocolo consistió en incubar una cantidad variable de proteína en tampón fosfato 0,067 M (pH 6,8), preincubada 1 h 30 min, con una concentración de glutaraldehído (10X), para llegar a la concentración final deseada de este agente ligante (0,01%). Según el ensayo, se agregó una concentración variable de KCl (0-0,4 M) o se varió el pH de la solución (pH 6,0-8,0). La reacción se realizó durante 30 min a temperatura ambiente, y se la detuvo con el agregado de trisglicina 1 M, pH 7,5 (10X). La visualización de los productos finales de la reacción se realizó por SDS-PAGE 12% y posterior tinción con Coomassie Blue o con nitrato de plata. Para este último caso, las proteínas presentes en el gel se fijaron con metanol al 10% por 5-10 min, luego se trató el gel con una solución de ácido nítrico al 1% por 3 min, se realizaron dos lavados con agua destilada, de 30 s cada uno, y

se dejó el gel sumergido por 20 min en una solución de nitrato de plata al 0,2%. Luego se lavó el gel con agua destilada y se sumergió en una solución de carbonato de sodio al 2,96% y formol al 0,054%, hasta lograr la intensidad deseada en la tinción. La reacción se frenó agregando ácido acético c.s.p. 10%. Una vez revelados, los geles se digitalizaron en un analizador de imágenes FUJIFILM. La cuantificación se realizó utilizando el programa ImageGauge V3.12. El valor de intensidad de cada banda se normalizó con un área seleccionada en cada caso, restando el *background* de la imagen, también normalizado por área (unidad de área/mm²). Posteriormente se calculó el porcentaje de intensidad normalizado para cada banda sobre la suma del total en la calle y se obtuvo así la proporción de monómero y especies entrecruzadas (dímeros).

Modelo matemático del equilibrio dímero-monómero

A partir de las ecuaciones fundamentales de un equilibrio reversible dímero-monómero, se construyó el modelo matemático para simular la variación en el PM_{aparente} en función de la concentración de UROD, sembrada en una columna de filtración molecular, o la AE en función de la concentración de enzima utilizada.



Formula I

Formula I

D: dímero, M: monómero, Kd: constante de disociación del equilibrio, [UROD]_{total}: concentración total de UROD en solución.

Despejando de la tercera ecuación la concentración del monómero [M] y reemplazando su valor en la ecuación de Kd, se obtiene:

$$Kd = ([UROD]_{total} - 2[D])^2 / [D]$$

Igualando la ecuación a 0 y obteniendo las raíces de esta ecuación cuadrática, se obtiene la ecuación que representa la variación de la concentración del dímero de la UROD, en función de la cantidad de UROD_{total} en la solución:

$$[D] = \frac{4 [UROD]_{total} + \{Kd + ((8[UROD]_{total} * Kd) + Kd^2)^{1/2}\}}{8}$$

En el caso de la filtración molecular, debido a las características del sistema en estudio, el PM observado para el pico de UROD puede ajustarse a la siguiente ecuación:

$$PM_{\text{aparente}} = PM_{\text{dímero}} * \text{fracción de dímero} = PM_{\text{dímero}} * 2 [D] / [UROD]_{\text{total}}$$

Formula II

Formula II

Reemplazando [D] por la ecuación obtenida anteriormente:

$$PM_{\text{aparente}} = PM_{\text{dímero}} * \frac{(4 [UROD]_{\text{total}} + Kd + ((8[UROD]_{\text{total}} * Kd) + Kd^2)^{1/2})}{4 [UROD]_{\text{total}}}$$

Formula III

Formula III

Donde PM_{aparente} es el PM estimado a través de los valores obtenidos de V_e/V_o en la columna de filtración molecular y $PM_{\text{dímero}}$ es el PM del dímero de la UROD cuando todas las moléculas que eluyen de la filtración molecular se encuentran en forma dimérica (fracción de dímero igual a 1).

Para el caso de la actividad enzimática, suponiendo que la única especie activa es el dímero de la UROD (monómeros no activos), la AE vendría dada por:

$$AE_{\text{observada}} = AE_{\text{máxima}} * \text{fracción de dímero} = AE_{\text{máxima}} * 2 [D] / [UROD]_{\text{total}}$$

$$AE_{\text{observada}} = AE_{\text{máxima}} * \frac{(4 [UROD]_{\text{total}} + Kd + ((8[UROD]_{\text{total}} * Kd) + Kd^2)^{1/2})}{4 [UROD]_{\text{total}}}$$

Formula IV

Formula IV

Donde: $AE_{\text{observada}}$ es la AE medida para una determinada concentración de UROD utilizada, $AE_{\text{máxima}}$ es la AE máxima de la UROD cuando toda la UROD en solución se encuentra como dímero.

Resultados

Expresión, purificación y caracterización cinética de UROD-h

Se logró expresar la enzima UROD-h clonada en *E. coli* BL21 (DE3) pLys y purificar hasta homogeneidad por medio de cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados (IMAC, Hist-tag) y filtración molecular Superdex 75. A partir de la elución de la cromatografía de afinidad se obtuvieron dos picos, que indican dos fuerzas de interacción distintas, que podrían corresponder a los dos estados oligoméricos de la proteína (dímero y monómero).

Posteriormente se verificó el grado de pureza obtenido a través de electroforesis en SDS-PAGE (Fig. 1), el cual mostró que el primer pico de elución se encontraba impurificado con otras proteínas. Para dicha muestra, se realizó un nuevo paso de purificación por filtración molecular Superdex 75 y se obtuvo una única banda, con un PM promedio de 52 ± 2 kDa, correspondiente al monómero de la UroD-6xHis (PM teórico 45 kDa) (Fig. 1, cuarta calle).

Características cinéticas de la UROD-h purificada

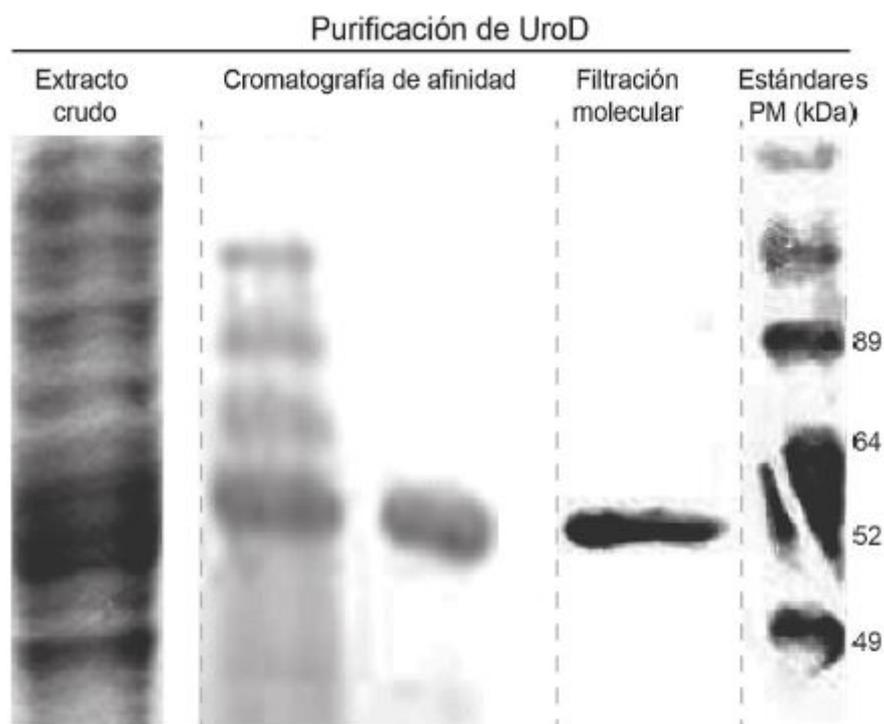


Figura 1. Purificación de la UROD-h. Se realizó una SDS-PAGE 12% de muestras obtenidas del proceso de purificación realizado. Se corrieron las muestras de UROD-h purificada a través de cromatografía de afinidad y por filtración molecular en columna Superdex 75. Los geles se tiñeron con Coomassie Blue. La última calle muestra los estándares de peso molecular utilizados (Benchmark Pre-Stained-Protein Ladder, Invitrogen).

Fig. 1

Purificación de UroD

Purificación de la UROD-h. Se realizó una SDS-PAGE 12% de muestras obtenidas del proceso de purificación realizado. Se corrieron las muestras de UROD-h purificada a través de cromatografía de afinidad y por filtración molecular en columna Superdex 75. Los geles se tiñeron con Coomassie Blue. La última calle muestra los estándares de peso molecular utilizados (Benchmark Pre-Stained-Protein Ladder, Invitrogen).

Los ensayos cinéticos con la proteína purificada evidenciaron actividad enzimática, tanto para la descarboxilación de uroporfirinógeno III (urogen III) como del pentaporfirinógeno I (pentagen I). A todas las concentraciones de urogen III ensayadas, se observaron porcentajes de descarboxilación en el rango 30-35%.

Debido a que los datos no se encontraron distribuidos homogéneamente y fueron muy cercanos, sobre todo a valores bajos de $1/[pentagen\ I]$, también se analizaron según el método de Hanes-Woolf, que se recomienda en estos casos (Fig. 2), con ambos sustratos. A partir de esos gráficos se obtuvo, con urogen III, un K_m de $6,3\ \mu M$ y una V_{max} de $0,031\ nmoles/min$ (Fig. 2A). El valor de K_m difiere del obtenido por de Verneuil *et al.* (21) que fue de $0,04\ \mu M$, probablemente debido a que usaron una mayor concentración de sustrato (tratando de acercarse a la saturación) y, a altas concentraciones, parte del sustrato se oxida durante la incubación provocando una menor V_{max} y una menor afinidad, dado que el sustrato oxidado inhibe competitivamente la reacción (21).

Analizando los datos para el pentagen I, mediante la representación de Hanes-Woolf (Fig. 2B), se vio que se ajustaban a una regresión lineal con un coeficiente r^2 de $0,996$. El valor de K_m fue $0,84\ \mu M$ y el de V_{max} $0,033\ nmoles/min$.

Reversibilidad del equilibrio dímero-monómero de la UROD en diferentes condiciones

Con el objetivo de evaluar la reversibilidad del equilibrio dímero-monómero de la UROD-h en diferentes condiciones y, posteriormente, utilizar esto para la evaluación de la actividad enzimática, se realizaron distintos ensayos donde se estudió el equilibrio dímeromonómero aplicando dos técnicas, filtración molecular y entrecruzamiento (*cross-linking*) con glutaraldehído.

En primer lugar, se sembró una muestra de UROD-h purificada hasta homogeneidad ($0,25\ mg/mL$) en una columna de filtración molecular Superdex 75, previamente calibrada con estándares de PM, como se describió en Materiales y Métodos. El perfil de elución presentó un único pico de elución asimétrico, con actividad UROD, con un frente líder (*leading edge*) agudo y un frente posterior (*trailing edge*) difuso (d.n.m). El PM estimado con la curva de calibración fue de $60\ kDa$ ($55-70\ kDa$), intermedio entre el peso teórico del dímero ($90\ kDa$) y el del monómero de la UROD ($52\ kDa$). Este comportamiento había sido informado por otros autores, entre ellos de Verneuil *et al.* (21) y Phillips *et al.* (7), quienes lo consideraron indicativo de que, en un sistema reversible, el dímero puede estar disociándose en el momento de la cromatografía.

Una de las características de cualquier equilibrio dinámico es su dependencia con respecto a la concentración de productos y reactivos. Así, en el caso de la UROD-h, a mayor concentración de la enzima, el equilibrio se desplazará hacia una mayor proporción de la especie dimerica, y viceversa. Esto sugiere que, en este caso, dependiendo de la concentración enzimática que se utilizó, el equilibrio se encontró más o menos desplazado hacia un lado u otro, y que esto sucediera es un indicio de que la enzima se encontraba en un equilibrio dinámico dímero \leftrightarrow monómero.

Los ensayos de filtración molecular mostraron que, a mayor concentración de UROD-h sembrada en la columna, el PM aparente

de la proteína eluida era mayor. Los resultados mostraron un comportamiento hiperbólico en función de la concentración de la proteína, relación típica en un equilibrio dímero \leftrightarrow monómero (Fig. 3A). Por análisis de regresión no lineal se observó un buen ajuste ($r^2=0,965$) al modelo de disociación teórico. El valor de K_d obtenido para el equilibrio dímero-monómero fue de $0,27\pm0,06 \mu\text{M}$, con un PM aparente máximo de $73\ 000\pm1300$ Da. El valor de K_d obtenido fue cercano al obtenido por Phillips *et al.* (7) a partir de la técnica de ultracentrifugación analítica ($0,11\pm0,06 \mu\text{M}$).

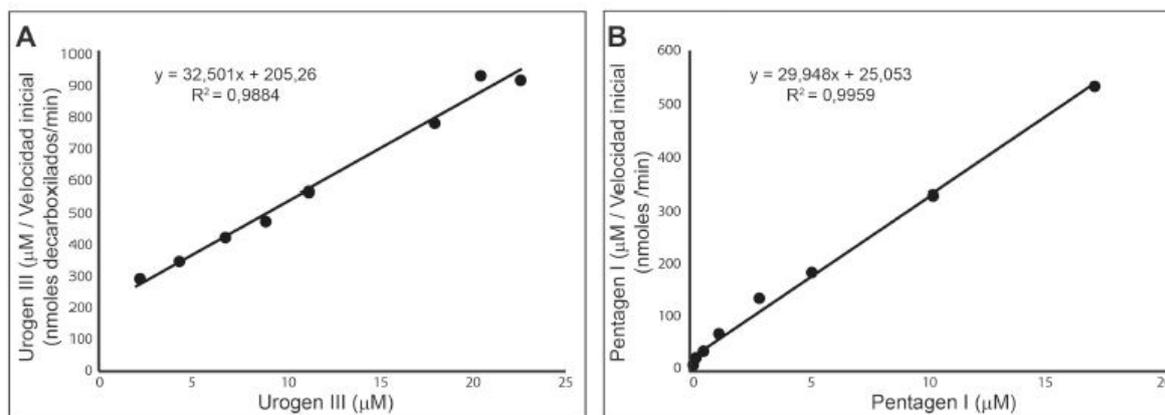


Figura 2. Obtención de parámetros cinéticos de UROD-h. A) Gráfico de Hanes-Woolf de la actividad UROD-h con urogen III como sustrato, el K_m obtenido fue $6,3 \mu\text{M}$ y la V_{max} $0,031$ nmoles/min. B) Gráfico de Hanes-Woolf de la actividad UROD-h con pentagen I como sustrato, el K_m fue $0,84 \mu\text{M}$ y la V_{max} $0,033$ nmoles/min. En ambos casos, los datos se ajustaron a una regresión lineal, reportándose en cada uno de ellos el modelo obtenido con su R^2 .

Fig. 2

Figura 2

Obtención de parámetros cinéticos de UROD-h. A) Gráfico de Hanes-Woolf de la actividad UROD-h con urogen III como sustrato, el K_m obtenido fue $6,3 \mu\text{M}$ y la V_{max} $0,031$ nmoles/min. B) Gráfico de Hanes-Woolf de la actividad UROD-h con pentagen I como sustrato, el K_m fue $0,84 \mu\text{M}$ y la V_{max} $0,033$ nmoles/min. En ambos casos, los datos se ajustaron a una regresión lineal, reportándose en cada uno de ellos el modelo obtenido con su R^2 .

Por su parte, los ensayos de incubación de distintas concentraciones de UROD-h con glutaraldehído presentaron también una curva hiperbólica (Fig. 3B). El porcentaje de dímero presente se estimó a partir de la cuantificación de las bandas de dímero y monómero obtenidas (Fig. 4A) y mostró un incremento del dímero en función de la concentración inicial de UROD-h utilizada en el ensayo.

Se estudió también el efecto del sustrato (urogen III) y de su forma oxidada (uroporfirina III) sobre el estado de dimerización de la enzima. Con estos ensayos se trató de evaluar un posible efecto del sustrato enzimático y de su forma oxidada sobre el estado de oligomerización de la UROD-h (Fig. 5A) y si alguno de los mecanismos de descarboxilación que se han propuesto era producto de un aumento en el estado de oligomerización de la enzima, por la unión de un ligando al sitio activo. La forma oxidada, si bien no es sustrato de la UROD, puede unirse a la misma y producir inhibición de la reacción enzimática. Los resultados de filtración molecular

indicaron un aumento del PM aparente cuando se preincubó la proteína con distintas concentraciones, tanto de urogen III como de la uroporfirina III (Fig. 5A). Los resultados obtenidos, para ambos sustratos y concentraciones utilizadas, evidenciaron que todas ellas favorecerían la dimerización de la UROD-h. Los ensayos se hicieron a dos concentraciones de urogen III, una en concentración equimolar con la enzima y otra 10 veces mayor, ya que se ha propuesto que, a bajas concentraciones, el sustrato entra al sitio activo y es descarboxilado en forma secuencial, en tanto que a altas concentraciones se descarboxila al azar (12) (13) (14).

Luego se probó el efecto de la fuerza iónica sobre el estado de dimerización de la UROD-h. Por medio de ensayos de filtración molecular, se observó que a medida que se incrementa la fuerza iónica del medio, se obtiene un mayor PM aparente, lo que sugeriría la existencia de interacciones electrostáticas críticas para la formación del mismo (Fig. 5B).

Por último, se evaluó el efecto del pH sobre el equilibrio de dimerización a través de ensayos de entrecruzamiento (Fig. 4B). El aumento del pH de la solución de preincubación, de pH 6 a pH 8, desplazó linealmente el equilibrio hacia la formación del dímero (Fig.5C).

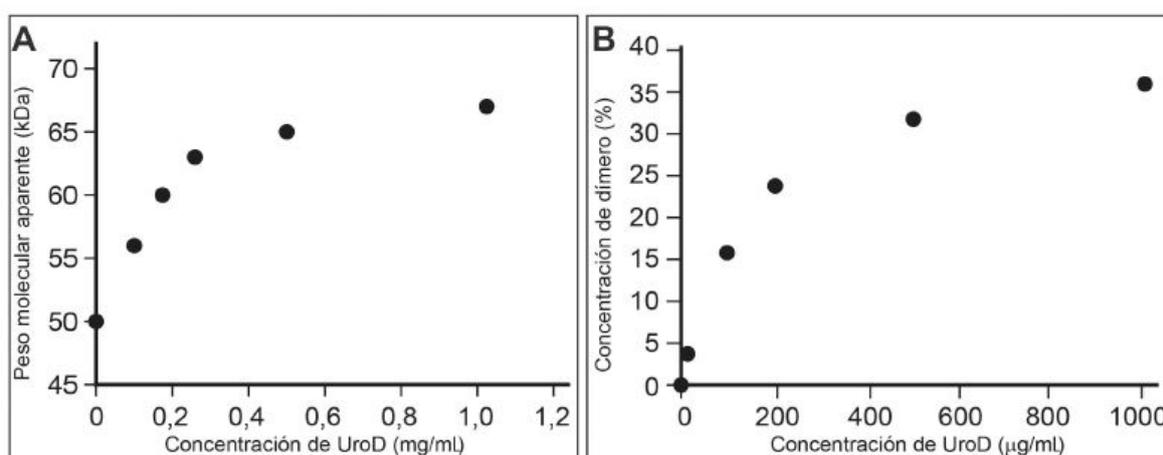


Figura 3. Efecto de la concentración de UROD-h sobre la dimerización enzimática. A) Variación en el peso molecular aparente de la UROD-h obtenido por filtración molecular a partir de distintas concentraciones iniciales de la enzima. B) Variación en el porcentaje de dímero obtenido por ensayos de entrecruzamiento (cross-linking) a partir de distintas concentraciones de UROD-h. En todos los casos, la descripción de las condiciones de cada ensayo se encuentra en la sección Materiales y Métodos.

Fig. 3

Figura 3

Efecto de la concentración de UROD-h sobre la dimerización enzimática. A) Variación en el peso molecular aparente de la UROD-h obtenido por filtración molecular a partir de distintas concentraciones iniciales de la enzima. B) Variación en el porcentaje de dímero obtenido por ensayos de entrecruzamiento (cross-linking) a partir de distintas concentraciones de UROD-h. En todos los casos, la descripción de las condiciones de cada ensayo se encuentra en la sección Materiales y Métodos.

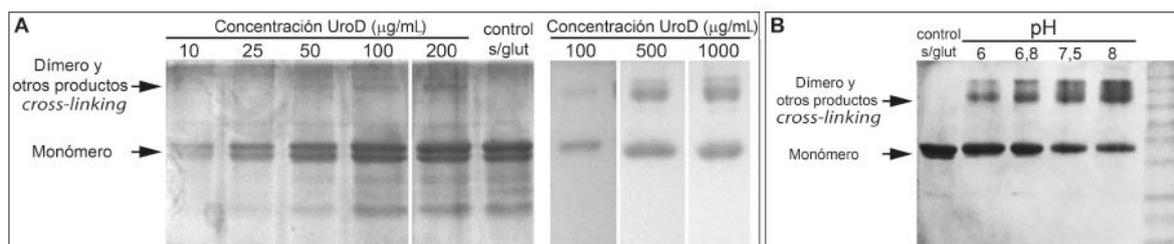


Figura 4. SDS PAGE 12% de ensayos de entrecruzamiento (cross-linking). A) Aumento de las especies entrecruzadas partiendo de distintas concentraciones de UROD-h, en el gel de la izquierda entre 100-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (tinción con Coomasie Blue), y a la derecha entre 10-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (tinción con plata), incluyendo el control sin glutaraldehído. B) Efecto del pH sobre el grado de especies entrecruzadas. En el gel se muestran variaciones obtenidas entre pH 6-8, y el control sin glutaraldehído. En todos los gels se demarcan con flecha la especie monomérica y las especies entrecruzadas consideradas.

Figura 4

Figura 4

SDS PAGE 12% de ensayos de entrecruzamiento (cross-linking). A) Aumento de las especies entrecruzadas partiendo de distintas concentraciones de UROD-h, en el gel de la izquierda entre 100-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (tinción con Coomasie Blue), y a la derecha entre 10-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (tinción con plata), incluyendo el control sin glutaraldehído. B) Efecto del pH sobre el grado de especies entrecruzadas. En el gel se muestran variaciones obtenidas entre pH 6-8, y el control sin glutaraldehído. En todos los gels se demarcan con flecha la especie monomérica y las especies entrecruzadas consideradas.

Efecto del desplazamiento del equilibrio dímeromonómero sobre la actividad enzimática de UROD-h

Luego de analizar el rango de concentraciones de UROD, donde se pudieron identificar diferentes composiciones de dímero-monómero, se estudió la variación de actividad enzimática de la UROD bajo estas condiciones, tanto para el urogen III como para pentagen I, como sustratos representativos de la primera y de la segunda etapa de la reacción, respectivamente.

Los resultados obtenidos, tanto para urogen III como para pentagen I, se muestran en las Figuras 6A y 6B respectivamente. En ambos casos se graficó también una curva teórica que representa el aumento de la AE en función de la concentración molar de la enzima, siguiendo un modelo dímero \leftrightarrow monómero, en donde la única especie activa es el dímero. Para urogen III no se observaron cambios significativos en la actividad UROD-h, en un rango de concentraciones entre 0,02 y 0,11 μM (1-5 μg de UROD-h) (Fig. 6A).

Esto sugeriría que, o bien el dímero y el monómero son activos enzimáticamente, o la curva de equilibrio se encuentra desplazada y, en estas condiciones, la K_d sería menor, quizás por efecto de la presencia del sustrato en el medio. En apoyo a la segunda hipótesis, se comprobó que a bajas concentraciones de UROD-h (entre 0,002 y 0,020 μM) la AE se encontraba disminuida, en comparación con la que presentó a mayores concentraciones enzimáticas. Por su parte, para pentagen I, dentro del rango de UROD-h ensayado entre 0,007 y 0,150 μM (0,3-7,0 μg de UROD-h), no se observaron cambios significativos en la actividad UROD (Fig. 6B).

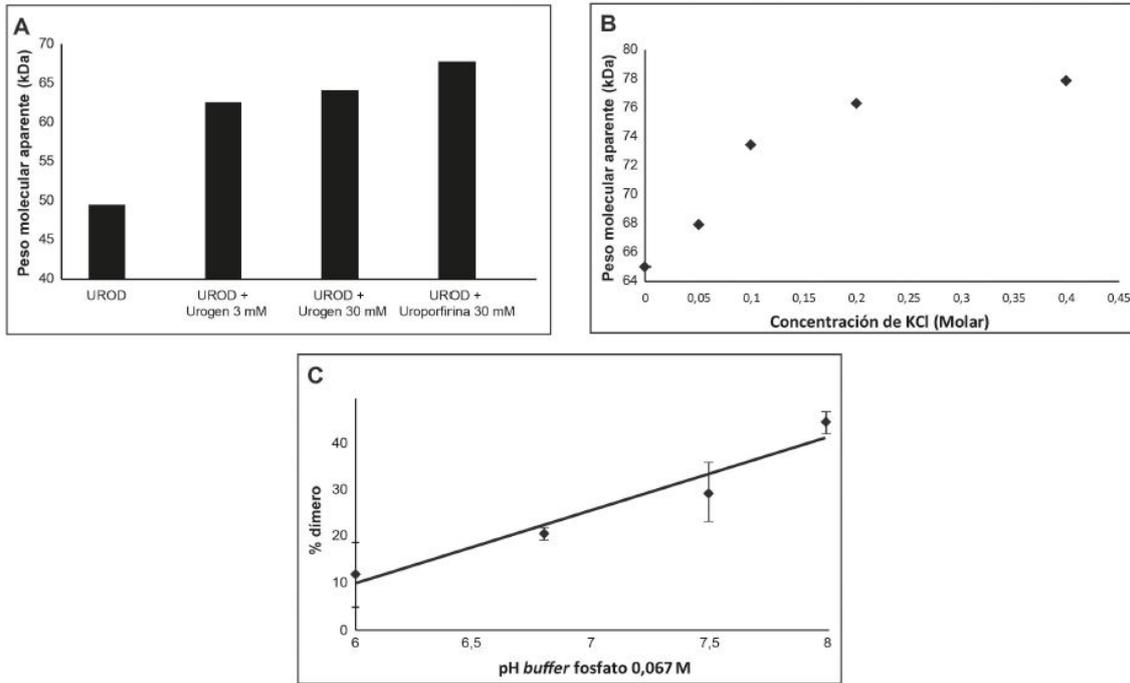


Figura 5. Factores que afectan el equilibrio de dimerización de la UROD-h. A) Efecto del urogen III y de su forma oxidada, la uroporfirina III, sobre el PM aparente de la enzima, analizado por filtración molecular, B) Efecto del KCl sobre el estado de dimerización de la UROD-h, analizado por filtración molecular (Superdex G-75), utilizando distintas concentraciones de KCl. C) Efecto del pH sobre el equilibrio dímero-monomero de UROD-h, utilizando distintos pH (rango pH 6-8) y analizando por ensayos de entrecruzamiento (cross-linking). Los datos graficados son el promedio de dos experiencias independientes y se ajustaron a un modelo de regresión lineal, con $r \geq 0,940$. En todos los casos, la descripción de las condiciones de cada ensayo se encuentra en la sección Materiales y Métodos.

Fig. 5

Figura 5

Factores que afectan el equilibrio de dimerización de la UROD-h. A) Efecto del urogen III y de su forma oxidada, la uroporfirina III, sobre el PM aparente de la enzima, analizado por filtración molecular, B) Efecto del KCl sobre el estado de dimerización de la UROD-h, analizado por filtración molecular (Superdex G-75), utilizando distintas concentraciones de KCl. C) Efecto del pH sobre el equilibrio dímero-monomero de UROD-h, utilizando distintos pH (rango pH 6-8) y analizando por ensayos de entrecruzamiento (cross-linking). Los datos graficados son el promedio de dos experiencias independientes y se ajustaron a un modelo de regresión lineal, con $r \geq 0,940$. En todos los casos, la descripción de las condiciones de cada ensayo se encuentra en la sección Materiales y Métodos.

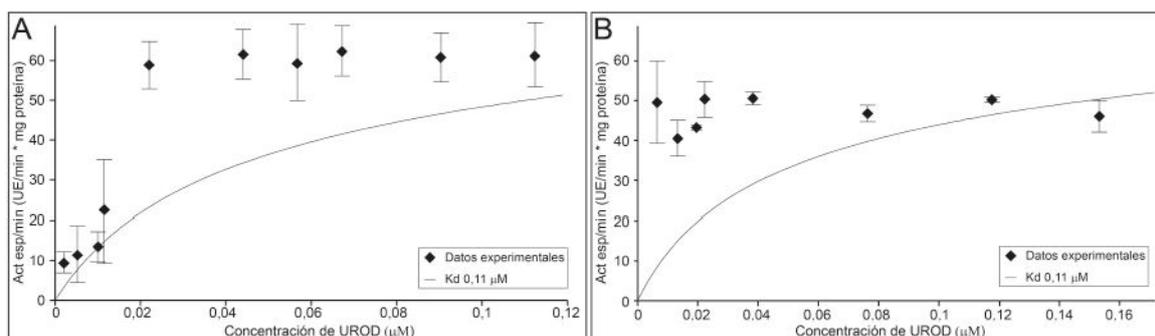


Figura 6. Efecto de la concentración de UROD-h en la actividad enzimática (AE) de la primera (6A) y segunda (6B) etapa de descarboxilación del urogen. Distintas concentraciones de UROD-h fueron preincubadas 90 min a temperatura ambiente, con urogen III 14 μM a pH 6,8 o con pentagen I 10 μM a pH 6,8. El tiempo de incubación a 37 °C fue de 15 min. Los resultados obtenidos están expresados en AE/min. La curva representa una simulación de la AE/min para un modelo en donde el dímero es la única especie activa de la UROD, con una K_d de 0,11 μM y una AE máxima de 90 UE/min/mg proteína. Las mediciones se realizaron por duplicado o triplicado.

Fig. 6

Figura 6

Efecto de la concentración de UROD-h en la actividad enzimática (AE) de la primera (6A) y segunda (6B) etapa de descarboxilación del urogen. Distintas concentraciones de UROD-h fueron preincubadas 90 min a temperatura ambiente, con urogen III 14 μM a pH 6,8 o con pentagen I 10 μM a pH 6,8. El tiempo de incubación a 37 °C fue de 15 min. Los resultados obtenidos están expresados en AE/min. La curva representa una simulación de la AE/min para un modelo en donde el dímero es la única especie activa de la UROD, con una K_d de 0,11 μM y una AE máxima de 90 UE/min/mg proteína. Las mediciones se realizaron por duplicado o triplicado.

Por último, se determinó la AE en función de la concentración de sal agregada para desplazar el equilibrio dímero-monómero y también los valores de actividad en presencia de KCl (actuando sobre la catálisis, o sea agregándolo solo al medio de incubación, sin preincubar con la UROD-h). Luego se graficó la diferencia entre cada par de valores y se observó un incremento de la AE con la fuerza iónica del medio (Fig. 7, línea curva), que, asociado al incremento observado de la dimerización en esas mismas condiciones (Fig. 7), sugiere que la especie activa para la descarboxilación es la forma homodimérica de la enzima.

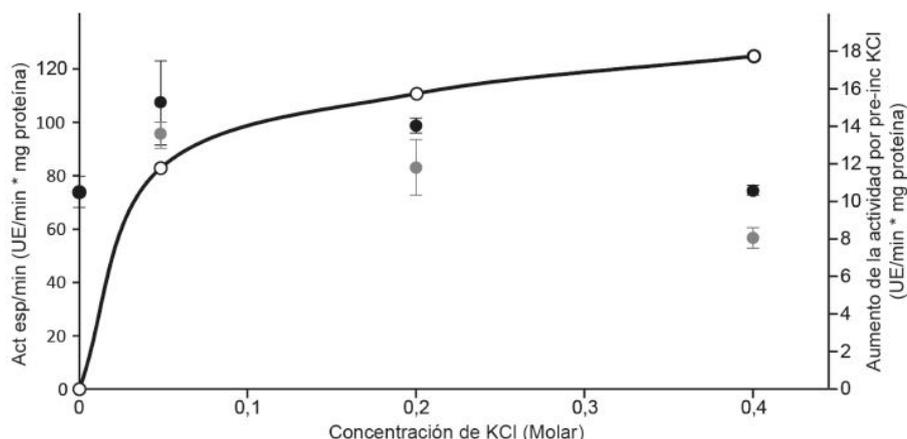


Figura 7. Efecto de la preincubación con KCl sobre la actividad enzimática. Se realizaron dos tipos de ensayos: en uno se preincubó y se midió actividad en presencia de distintas concentraciones de KCl (puntos negros) y, en el otro, la enzima se preincubó en tampón fosfato de potasio y la actividad se midió en presencia de distintas concentraciones de la sal (puntos grises). La preincubación se realizó durante 100 min a temperatura ambiente y la actividad se midió a 37 °C por 15 min, con 1 μ g de enzima total y urogen III 8,4 μ M. Puntos blancos: diferencia entre las dos actividades obtenidas a cada concentración de KCl. Se realizaron dos experimentos independientes.

Fig. 7

Figura 7

Efecto de la preincubación con KCl sobre la actividad enzimática. Se realizaron dos tipos de ensayos: en uno se preincubó y se midió actividad en presencia de distintas concentraciones de KCl (puntos negros) y, en el otro, la enzima se preincubó en tampón fosfato de potasio y la actividad se midió en presencia de distintas concentraciones de la sal (puntos grises). La preincubación se realizó durante 100 min a temperatura ambiente y la actividad se midió a 37 °C por 15 min, con 1 μ g de enzima total y urogen III 8,4 μ M. Puntos blancos: diferencia entre las dos actividades obtenidas a cada concentración de KCl. Se realizaron dos experimentos independientes.

Discusión y Conclusiones

El objetivo principal de este trabajo fue estudiar la relación entre la dimerización de la enzima UROD y su actividad enzimática, de manera de determinar si el monómero era o no activo enzimáticamente, tendiendo a esclarecer el mecanismo de la reacción. Para ello se procedió a la obtención y al aislamiento de la UROD-h y a su caracterización bioquímica. Aplicando distintas metodologías se estudió la UROD y el efecto de distintos tratamientos, tendientes a variar su equilibrio de dimerización y tratar de correlacionarlo con la actividad enzimática.

Los resultados obtenidos en este trabajo presentan evidencias a favor de un modelo de equilibrio dímero \leftrightarrow monómero para la UROD-h, que previamente se había descrito solamente por equilibrio de sedimentación y cristalografía de rayos X. Esta es la primera vez que se presentan datos que apoyan la teoría del equilibrio mediante ensayos de filtración molecular y de entrecruzamiento, incrementando la certeza de que la UROD-h se comporta como dímero en solución.

En primer lugar, mediante la técnica de tamizaje molecular, se presentaron evidencias a favor de un equilibrio reversible, por ensayos en los que el volumen de elución de la proteína varió en función de la cantidad sembrada, de manera hiperbólica y ajustándose a un modelo de regresión no lineal. Por su parte, la técnica de entrecruzamiento, o

cross-linking, también permitió obtener más evidencias a favor de este modelo. El porcentaje de especies entrecruzadas, en función de la concentración de proteína incubada, presentó una curva hiperbólica, en donde el porcentaje de estas especies aumentó con la concentración proteica. El tipo de equilibrio que presenta la UROD-h, observado por filtración molecular, hace muy difícil el aislamiento del monómero, ya que siempre aparece un pico de elución intermedio a los que corresponderían al monómero y al dímero respectivamente. Por tal motivo, no se pudo aislar un pico correspondiente solo al monómero de la UROD-h para determinar su actividad enzimática, como se ha logrado con otras enzimas oligoméricas (26) (27).

El valor de K_d , obtenido por el método de filtración molecular, fue de $0,27 \pm 0,06 \mu\text{M}$, en tanto que el previamente publicado era de $0,11 \pm 0,06 \mu\text{M}$ (1), estimado por ultracentrifugación analítica. La ligera diferencia encontrada puede estar reflejando la utilización de distintas técnicas para estimar la constante. Sin embargo, a pesar de que la filtración molecular no es una técnica tan sensible como la ultracentrifugación analítica para calcular la K_d , permitió obtener un resultado similar al determinado por de Verneuil *et al.* (1). Además, las condiciones en las cuales se midieron las constantes de disociación fueron diferentes en esos ensayos, ya que en la filtración molecular el tampón fue fosfato de potasio 0,134 M, pH 6,8, en cambio en la ultracentrifugación fue tris-HCl 50 mM, pH 7,5. Esta variación, tanto en el pH como en otros componentes del medio de incubación, podría estar alterando el equilibrio de la UROD-h a favor de la dimerización, tal como se obtuvo cuando se incubó la UROD-h a distintos pH o con KCl en el medio.

Los ensayos de entrecruzamiento, dentro de un rango de pH entre 6 y 8, evidenciaron que a mayor pH se observaba un mayor el porcentaje de dímero, lo que sugeriría la existencia de interacciones electrostáticas críticas para la formación del dímero. Al analizar los aminoácidos, presentes en la interfaz de dimerización de la enzima, se comprobó que existen varios aminoácidos cargados tanto positiva como negativamente y que son factibles de formarse hasta trece puentes salinos, entre siete pares de aminoácidos diferentes, donde el más importante parece ser Asp306-Lys178. Por otra parte, en la UROD proveniente de *Nicotiana tabacum* se observó una dependencia de la dimerización con respecto a la fuerza iónica del medio (16). Mediante la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS), los autores observaron que la UROD en tampón Tris-HCl 10 mM, pH 7, presentaba un PM de 57,5 kDa, es decir 1,5 veces el peso del monómero, pero si al tampón se le adicionaba una concentración 50 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ el PM aumentaba a valores cercanos al del dímero (81,2 kDa), lo que sugería que la sal afectaba el equilibrio de dimerización. Los resultados presentados en este trabajo apoyan la hipótesis de que las interacciones electrostáticas juegan un papel importante en la dimerización de la UROD y que la fuerza iónica podría tener un efecto neutralizador de las cargas negativas, presentes en la superficie de la enzima, estabilizando la forma dimérica de la UROD-h. Un estudio teórico de los pKa de los distintos aminoácidos

presentes en la interfaz podrá dar más indicaciones sobre cuál o cuáles son las interacciones que varían en el rango de pH analizado.

Al analizar la dependencia de la AE en función de la concentración enzimática, en un rango de concentraciones por encima y por debajo de la K_d reportada, se observaron resultados distintos según el sustrato utilizado. Cuando se utilizó urogen III como sustrato, se observó que la AE disminuyó a muy bajas concentraciones, pero los valores obtenidos en todo el rango se diferenciaron de lo esperado si la única especie activa fuera el dímero. En cambio, cuando se utilizó pentagen I como sustrato, aún a tan bajas concentraciones como $0,007 \mu\text{M}$, no se observó una variación en la AE de la enzima, lo que sugiere que tanto el dímero como el monómero poseen la misma actividad enzimática. Los resultados obtenidos por tamizaje molecular, respecto al desplazamiento del equilibrio a favor de la forma dimérica en presencia de este sustrato, apoyan la teoría del dímero activo para el primer paso de descarboxilación del urogen III. El sustrato tiende a estabilizar la forma dimérica de la UroD.

Otro experimento, que apoya la idea de que la única especie activa con urogen III como sustrato es el dímero, es el que se realizó en presencia de KCl. En el presente trabajo se logró separar el efecto de la sal sobre el sitio activo de la enzima del efecto sobre la dimerización. Como se había observado que la medición de actividad con KCl en el medio inhibía la reacción, se analizó el efecto de la sal sobre la actividad, debida exclusivamente a un efecto sobre el equilibrio de dimerización. De este modo, se independizó el efecto directo del KCl sobre el sitio activo. La diferencia entre los resultados obtenidos a iguales concentraciones de KCl fue igual a la variación de la AE debida solo al efecto del KCl sobre la dimerización. Esto permitió llegar a la conclusión que, para urogen III, un aumento de la concentración de KCl favorece la dimerización y a su vez provoca un aumento de la AE, lo que indica que la especie activa sería el dímero de la UROD-h. Straka y Kushner, estudiando la UROD bovina (28), demostraron la influencia de la fuerza iónica sobre su actividad enzimática y que la actividad de la UROD variaba con la concentración del catión monovalente ensayado. Los resultados, obtenidos en el presente trabajo, son consistentes con los encontrados por dichos autores.

En síntesis, los resultados aquí presentados sugieren que la descarboxilación del primer sustrato necesitaría de la formación del dímero, en cambio la descarboxilación del último sustrato (el pentagen) no la necesitaría. Esto no significa que la descarboxilación del urogen ocurra en un único sitio activo presente en el dímero, ya que cuando se cristalizó la UROD en presencia de coprogen (producto final), en ambas subunidades se encontró este producto (8). Posiblemente, el cambio conformacional que se da en la proteína, al formarse el dímero, sea necesario para la descarboxilación de urogen III, pero no para la descarboxilación del pentagen I para dar coprogen. Si bien hacen falta más estudios para poder corroborar la hipótesis aquí planteada, este trabajo abre las puertas a otros estudios que permitan profundizar y verificar las hipótesis que promueve.

Finalmente, es importante destacar que la mutación Y311C (8) (9) (10) (localizada en el sitio de dimerización) y encontrada en pacientes con PCT, podría estar desencadenando la disminución de la actividad enzimática de la UROD y, como consecuencia, la enfermedad, sin afectar directamente el sitio activo de cada monómero, sino su sitio de interacción con la otra subunidad. Mutaciones que afecten el dominio de dimerización, como la citada Y311C podrían, como consecuencia de esto, afectar la actividad enzimática de la UROD-h, dando inestabilidad al dímero y desencadenando así la enfermedad.

Correspondencia

Dra. MARÍA DEL CARMEN RÍOS DE MOLINA
Correo electrónico: madelcrios@gmail.com

Fuentes de financiación

Las fuentes de financiación para la realización de este trabajo fueron subsidios del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y de la Universidad de Buenos Aires, Directora: Dra. Ríos de Molina. Los datos respaldatorios de las investigaciones realizadas están contenidos en el repositorio digital institucional de acceso abierto, en la Biblioteca Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, de la Universidad de Buenos Aires.

Referencias bibliográficas

1. De Verneuil H, Grandchamp B, Nordmann Y. Some kinetic properties of human red cell uroporphyrinogen decarboxylase. *Biochim Biophys Acta* 1980 Jan; 611 (1): 174-86.
2. Elder GH, Tovey J, Sheppard D. Purification of uroporphyrinogen decarboxylase from human erythrocytes. Immunochemical evidence for a single protein with decarboxylase activity in human erythrocytes and liver. *Biochem J* 1983 Oct; 215 (1): 45-55.
3. Silva PJ, Ramos J. Density-functional study of mechanisms for the cofactor-free decarboxylation performed by uroporphyrinogen III decarboxylase. *J Phys Chem B* 2005 Sep; 109 (38): 18195-200.
4. Fan J, Liu Q, Hao Q, Teng M, Niu L. Crystal structure of uroporphyrinogen decarboxylase from *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 2007 May; 189 (9): 3573-80.
5. Elder GH, Worwood M. Mutations in the hemochromatosis gene, porphyria cutanea tarda, and iron overload. *Hepatology* 1998 Jan; 27 (1): 289-91.
6. Romeo P-H, Raich N, Dubart A, Beaupain D, Pryor M, Kushner J, *et al*. Molecular cloning and nucleotide sequence of a complete human uroporphyrinogen decarboxylase cDNA. *J Biol Chem* 1986 Jul; 261 (21): 9825-31.
7. Phillips JD, Whitby FG, Kushner JP, Hill CP. Characterization and crystallization of human uroporphyrinogen decarboxylase. *Prot Sci* 1997 Jun; 6 (6): 1343-6.
8. Phillips JD, Whitby FG, Kushner JP, Hill CP. Structural basis for tetrapyrrole coordination by uroporphyrinogen decarboxylase. *EMBO J* 2003 Dec; 22 (23): 6225-33.
9. Whitby FG, Phillips JD, Kushner JP, Hill CP. Crystal structure of human uroporphyrinogen decarboxylase. *EMBO J* 1998 May; 17 (9): 2463-71.
10. Moran-Jimenez MJ, Ged C, Romana M, Enríquez De Salamanca R, Taïeb A, D'Alessandro L, *et al*. Uroporphyrinogen decarboxylase: complete human gene sequence and molecular study of three families with hepatoerythropoietic porphyria. *Am J Hum Genet* 1996 Apr; 58 (5): 712-21.
11. Bonkovsky HL, Poh-Fitzpatrick M, Pimstone N, Obando J, Di Bisceglie A, Tattrie C, *et al*. Porphyria cutanea tarda, hepatitis C, and HFE gene mutations in North America. *Hepatology* 1998 Jun; 27 (6): 1661-9.
12. Weiss Y, Chen B, Yasuda M, Nazarenko I, Anderson KE, Desnick RJ. Porphyria cutanea tarda and hepatoerythropoietic porphyria: identification of 19 novel uroporphyrinogen III decarboxylase mutations. *Mol Genet Metab* 2019 Nov; 128 (3): 363-6.

13. Shah A, Bhatt H. Cutanea tarda porphyria. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022.
14. Phillips JD, Parker TL, Schubert HL, Whitby FG, Hill CP, Kushnir JP. Functional consequences of naturally occurring mutations in human uroporphyrinogen decarboxylase. *Blood* 2001 Dec; 98 (12): 3179-85.
15. Luo J, Lim CK. Order of uroporphyrinogen III decarboxylation on incubation of porphobilinogen and uroporphyrinogen III with erythrocyte uroporphyrinogen decarboxylase. *Biochem J* 1993 Feb; 289 (Pt 2): 529-32.
16. Lash TD. Action of uroporphyrinogen decarboxylase on uroporphyrinogen III: a reassessment of the clockwise decarboxylation hypothesis. *J Biochem* 1991 Sep; 278 (Pt 3): 901-3.
17. Luo J, Lim CK. Decarboxylation of uroporphyrinogen III by erythrocyte uroporphyrinogen decarboxylase. Evidence for a random decarboxylation mechanism. *Biochem J* 1990 Jun; 268 (2): 513-5.
18. Akhtar M. The modification of acetate and propionate side chains during the biosynthesis of haem and chlorophylls: mechanistic and stereochemical studies. *Ciba Found Symp* 1994; 180: 131-51; discussion 152-5.
19. Martins BM, Grimm G, Mock H-P, Hubert R, Messerschmidt A. Crystal structure and substrate binding modeling of the uroporphyrinogen III decarboxylase from *Nicotiana tabacum*. Implications for catalytic mechanism. *J Biol Chem* 2001 Nov; 276 (47): 44108-16.
20. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1975 May; 72: 248-54.
21. de Verneuil H, Sassa S, Kappas A. Purification and properties of uroporphyrinogen decarboxylase from human erythrocytes. A single enzyme catalyzing the four sequential decarboxylations of uroporphyrinogens I and III. *J Biol Chem* 1983 Feb; 258 (4): 2454-60.
22. Billi de Catabbi S, Ríos de Molina MC, San Martín de Viale LC. Studies on the active centre of rat liver porphyrinogen carboxylase *in vivo* effect of hexachlorobenzene. *Int J Biochem* 1991; 23 (7-8): 675-9.
23. Lim CK, Rideout JM, Wright DJ. Separation of porphyrins isomers by high-performance liquid chromatography. *Biochem J* 1983 May; 211 (2): 435-8.
24. Mauzerall D, Granick S. Porphyrin biosynthesis in erythrocytes. Uroporphyrinogen and its decarboxylase. *J Biol Chem* 1958 Jun; 232 (2): 1141-62.
25. Lee HJ, Wilson IB. Enzymic parameters: measurements of V and K_M . *Biochim Biophys Acta* 1971 Sep; 242 (3): 519-22.

26. Wyckoff EE, Phillips JD, Sowa AM, Franklin MR, Kushner JP. Mutational analysis of human uroporphyrinogen decarboxylase. *Biochim Biophys Acta* 1996 Dec; 1298 (2): 294-304.
27. Ehrig T, Muhoberac BB, Brems D, Bosron WF. Monomers of human $\beta_1\beta_1$ alcohol dehydrogenase exhibit activity that differs from the dimer. *J Biol Chem* 1993 Jun; 268 (16): 11721-6.
28. Straka JG, Kushner JP. Purification and characterization of bovine hepatic uroporphyrinogen decarboxylase. *Biochem* 1983 Sep; 22 (20): 4664-72.

Notas

Conflictos de intereses Los autores declaran no tener conflictos de intereses respecto del presente trabajo.

Notas de autor

- 1 Licenciado en Ciencias Biológicas, Doctor en ciencias Biológicas.
- 1 Licenciado en Ciencias Biológicas, Doctor en Ciencias Biológicas.
- 1 Licenciada en Ciencias Biológicas, Doctora en ciencias Biológicas
- 2 Licenciada en Ciencias Químicas, Doctora en Ciencias Químicas.

madelcrios@gmail.com