



Universitat Autònoma de Barcelona

**INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR DE BARCELONA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ESTRUCTURAL
(CSIC)**

**Estudio estructural y funcional de malonil-CoA
descarboxilasa humana, un enzima peroxisomal
clave en la regulación de malonil-CoA y ácidos
grasos**

Tesis Doctoral 2013
David Aparicio Alarcón

Director: Prof. Ignacio Fita Rodriguez
IBMB-CSIC



Universitat Autònoma de Barcelona

**INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR DE BARCELONA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ESTRUCTURAL
(CSIC)**

Estudio estructural y funcional de malonil-CoA descarboxilasa humana, un enzima peroxisomal clave en la regulación de malonil-CoA y ácidos grasos

Memoria de tesis presentada por David Aparicio Alarcón, inscrita en el programa Estructura y Función de Proteínas del Instituto de Biotecnología y Biomedicina de la Universidad Autónoma de Barcelona para optar al grado de Doctor.

Tesis Doctoral 2013

Tutor
Xavier Daura Ribera
IBB

Director
Ignacio Fita Rodriguez
IBMB-CSIC

AGRADECIMIENTOS

Después de casi 6 años, ha llegado un momento importante en el que uno se siente orgulloso de poder finalizar un proyecto en el cuál se ha invertido mucho esfuerzo y dedicación. De la misma forma, he recibido una formación académica exquisita y he compartido momentos inolvidables dentro del grupo.

Llegado este momento, querría agradecer sobremanera a Ignacio, por darme la confianza de formar parte de su grupo de investigación. También por las largas horas que hemos pasado delante del ordenador, resolviendo la estructura y compartiendo sus siempre interesantes puntos de vista sobre la ciencia y la simetría. Agradecerle el esfuerzo que ha demostrado en todo momento por hacer posible el final de esta etapa, que concluye con una tesis y un enriquecimiento a nivel personal en todos los niveles, tanto profesional como humano.

Thanks also to Peter C. Loewen, for his always kind and elegant lifestyle and to offer me the opportunity to continue the thesis work in his group.

Al Prof. Miquel Coll, per acceptarme al seu grup per fer les pràctiques d'empresa i començar aquest camí ple d'alts i baixos que és la cristal·lografia. A Fran Fernández, per introduir-me al món dels clonatges, les proves d'expressió i refolding.

A la Dra. Núria Verdaguer per obrir-me les portes del seu laboratori per fer qualsevol experiment, i tenir la sort de conèixer la gent que treballa al seu grup.

Al Dr. Joan C. Ferrer, per il·lustrar-nos una visió de la cooperativitat enzimàtica tan interessant i emocionant durant les reunions. A la Mireia del grup del Joan Carles, per facilitar-me infinitament els experiments cinètics.

To Dr. Andrew Thompson, for the help offered during the datasets collection and processing at Proxima1 beamline.

A la plataforma de proteïnes del Dr. Nicholas S. Berrow por las ayudas en la construcción de los mutantes.

Al Dr. Manuel Palacín por darme la oportunidad de trabajar unos meses en su laboratorio y conocer a su grupo.

A toda la gente del laboratorio de Manuel, José L, Paola B, Lukasz, Elena G., Eva V., Joana F., Meritxell C., Susana B., Miriam A., Judith A., Olga B., Víctor, gracias a todos por la paciencia en indicarme dónde estaba cada uno de los reactivos que necesitaba, y por invitarme a aquella fiesta de grupo en la que me sentí como uno más de vosotros. Especialmente gracias a Laura Rodríguez por

nuestras charlas inacabables y a Albert Rosell por su humor y alegría ante cualquier adversidad. También a Juan Carlos por nuestras risas en los encuentros de pasillos.

A todo el equipo de la plataforma, Alícia, Joan, Judith, Sonia, Robert gracias por ayudarnos en la difícil elección de escoger screenings, preparar las optimizaciones y por hacer más fácil nuestro trabajo.

A Jenny, por ser una de las personas que más profesionalidad me ha transmitido a lo largo de estos años, y por su voluntad de ayudarnos e instruirnos en nuestra dura tarea diaria de purificación.

Agradecer el apoyo y ánimo de mis compañeros de laboratorio, que sin ellos no hubiese sido lo mismo todos estos años. Gracias a Xavi C., por introducirme pacientemente en linux y en el procesado, también por llevarme la primera vez al sincrotón, que fue toda una experiencia para mi. A Bárbara, por la atención dedicada a todos nosotros, ha sido como la hermana mayor del grupo. A Rosa, que gracias a ella y su metódica forma de trabajar conseguimos finalmente los cristales de la estructura. A Queralt, por su incondicionalidad para ayudar en los experimentos y preparar barbacoas multitudinarias en su casa. A María por contagiar su carácter alegre y risueño al laboratorio y por nuestro viaje al sincrotón con Luca. A Luca por enseñarnos a vivir la vida con intensidad y por la leche de pantera y sus consecuencias! A la Mercè, per aquella sortida en bici que vàrem fer just quan acabava d'entrar al grup d'en Manuel. Va estar molt divertida! No teníem ni idea de com funcionava el GPS... A l'Albert pel viatge que vàrem compartir a l'India. Per el "Today, self Journey!! I les tiger prawns!! A l'Oriol G., per aquell viatge en que sense saber-ho, ens havia invitat a Heidelberg, gran persona. Gracias a todos, por hacer inolvidable mi estancia en CRI2, y hacer de todos nosotros como una gran familia.

A tot CRI6, i en especial a Damià, Arnau, Jordi i Thiago pel viatge que vàrem compartir a Mèxic. A todos los miembros de CRI1, con los que hemos tenido la suerte de compartir todo lo que había en ambos laboratorios. En especial, gracias a Lionel, y Roeland por las incansables veces en las que les he molestado con mis preguntas cristalográficas y me han ayudado. Al Dani B. (Chiiigriiiii) y la Nayibe, per les nostres converses al vostre passadís. A l'Esther F., que tot i haver-la conegut tard, m'ha sorprès gratament de la gran persona que és. A Robert por sus fiestas temáticas en casa. A todos los CRI7, Nere por su delicadeza en hacer las cosas, Anna R., por mostrarse con desparpajo y naturalidad por los pasillos. A Pablo por sus bromas ácidas y por aguantarme durante todo el curso de doctorado.

Agradecer a todos los grupos y personas de CRI que me han ayudado a lo largo de estos años. También con los que he compartido sincrotonadas.

A los compañeros de doctorado. Que gran experiencia compartir todas las aventuras y fiestas que nos montábamos cada vez que visitábamos una ciudad diferente.

A los de la Universidad, y en especial Jaime, Jess, Laia, Laura y Anna. Por todo lo que hemos compartido durante los viajes que hemos hecho juntos. Tenerife, Pamplona, Platja d'Aro... y las incontables noches de fiesta que hemos quemado juntos.

A mis fieles amigos, Guillem, Toni, Antonio y Oriol. Gracias por los momentos vividos en nuestras aventuras y desventuras. Porque sin vosotros la vida no es igual de emocionante.

Agradecer a mi familia, que es lo más preciado de mi vida: A mi hermano por cuidarme como lo que soy, el hermano pequeño. A mis padres por darme todo el cariño y afecto que he recibido y por estar ahí siempre que los he necesitado. A mi cuñada Susana por formar una familia con mi hermano y traer al mundo a mis queridas sobrinitas Júlia y Laia, las que me han dado una dimensión diferente de la vida. A los padres y hermana de Raquel, que han abierto las puertas de su casa de par en par a mi persona. Y muy especialmente a Raquel, gracias por aguantar todo este temporal de tesis, por quererme tal y como soy, y por querer compartir el maravilloso viaje de la vida junto a mí.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

MCD	Malonil-CoA Descarboxilasa
CPT1	Carnitina Aciltransferasa 1
GNAT	N-acetiltransferasa relacionada con GCN5
GCN5	General control nonrepressed. Control general no reprimido
NAD/H	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADP/H	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
CoA	Coenzima A
ROS	Reactive oxygen species. Espécies reactivas de oxígeno
SOD1	Superóxido dismutasa
GSTK1	Glutación s-transferasa kappa
PRDX1/5	Peroxiredoxina
PBD	Peroxisome biogenesis disorder
PEX	Peroxina
RE	Retículo endoplasmático
COPI/II	Coat protein
PMP	Proteína peroxisomal de membrana
ATP	Adenosina trifosfato
PTS1/2	Peroxisomal targeting signal. Secuencia de reconocimiento peroxisomal
TPR	Tetratricopeptide domain. Dominio tetratricopéptido
WD40	Beta transducin repeats. Repeticiones beta transducina
DysF	Dysferlin. Disferlina
Ubc4/5	Ubiquitin conjugating enzyme. Enzima conjugada de ubiquitina
AAA	ATPases Associated with diverse cellular Activities. ATPasas asociadas con diversas actividades celulares
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
G3P	Gliceraldehido-3-fosfato
GNPAT	Dihidroxiacetona fosfato O-aciltransferasa

AGPS	Alquil DHAP sintasa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
SOH	Ácido sulfénico
SO ₂ H	Ácido sulfínico
SO ₃ H	Ácido sulfónico
GSH	Glutati6n
VLCFA	Very long chain fatty acids. cidos grasos de cadena muy larga
LCFA	Long chain fatty acids. cidos grasos de cadena muy larga
FADH ₂	Adenina dinucle6tido de flavina
ACOX1/2	Enzima peroxisomal Acil-CoA oxidasa
LBP	Enoil-CoA hidratasa
DBP	3-hidroxi-acil-coa deshidrogenasa
ACAA1	Acetil-CoA aciltransferasa
kDa	kiloDaltons
kb	kilobase
Km o S _{0.5}	Concentraci6n de sustrato necesaria para alcanzar la mitad de velocidad máxima de la reacci6n
Vmax	Velocidad máxima de la reacci6n
Kcat	Eficiencia catalítica
siRNA	Small interference RNA. RNA pequeño de interferencia
RNA	Ribonucleic acid. cido ribonucleico
AMPK	Proteína quinasa dependiente de AMP
AMP	Adenosina mono fosfato
PPAR	Peroxisome proliferator activated receptor. Receptor activador proliferador del peroxisoma
ACC	Acetil-CoA carboxilasa
tRNA	RNA transferencia
RNA P	RNA polimerasa
DLS	Dynamic light scattering. Difusi6n dinámica de la luz
DNA	Deoxyribonucleic acid. cido desoxiribonucleico

PVDF	Polifluoruro de vinilideno
MBP	Maltose binding protein. Proteína de unión a maltosa
PCR	Polymerase chain reaction. Reacción en cadena de la polimerasa
TEV	Tobacco etch virus protease. Proteasa del virus etch de la planta del tabaco
IPTG	Isopropyl-B-D-thiogalactopyranoside. Isopropil-B-D-1tiogalactopiranosido
SeMet	Seleniometionina
DTT	Dithiothreitol. Ditiotreititol
EDTA	Etylenediaminetetraacetic acid. Ácido etilendiaminotetraacético
PBS	Phosphate buffered saline. Tampón fosfato
SD	Superdex
DSF	Differential scanning fluorimetry. Fluorimetría diferencial de barrido
ESRF	European Synchrotron Radiation Facility.
ID	Insertion Device.
SAD	Single wavelength anomalous dispersion.
PDB	Protein data Bank. Banco de datos de proteína.
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.
PMF	Peptide mass fingerprinting. Huella peptídica
rmsd	Root mean square deviation. Raíz cuadrada media de la desviación

CÓDIGO DE UNA Y TRES LETRAS PARA LOS AMINOÁCIDOS

A	Ala	Alanina
C	Cys	Cisteína
D	Asp	Ácido Aspártico
E	Glu	Ácido glutámico
F	Phe	Fenilalanina
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
K	Lys	Lisina
L	Leu	Leucina
M	Met	Metionina
N	Asn	Asparagina
P	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
W	Trp	Triptófano
Y	Tyr	Tirosina

ÍNDICE

RESUMEN	5
1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1 Peroxisomas.....	11
1.1.1 Visión general del peroxisoma	11
1.1.2 Biogénesis del peroxisoma	13
1.1.3 Peroxinas (Pex).....	15
1.2 Importación de proteínas a la matriz peroxisomal	15
1.2.1 Secuencias señal de importación a la matriz peroxisomal	16
1.2.2 Maquinaria de importación hacia el peroxisoma.....	17
1.2.3 Liberación de proteínas peroxisomales	19
1.2.4 Regeneración cíclica de receptores PTS y ubiquitinación	20
1.3 Funciones fisiológicas del peroxisoma	21
1.3.1 Biosíntesis de plasmalógenos	22
1.3.2 Metabolismo de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	24
1.3.3 ROS en desarrollo animal y señalización Wnt.....	27
1.3.4 Degradación de aminoácidos-pr	28
1.3.5 Beta oxidación de ácidos grasos	29
1.3.6 Malonil CoA descarboxilasa peroxisomal y acidúria malónica.....	32
1.4 Malonil-CoA descarboxilasa citoplasmática y mitocondrial.....	34
1.4.1 Malonil-CoA Descarboxilasa en metabolismo energético	34
1.4.2 Malonil-CoA y resistencia a insulina	37
1.4.3 Malonil-CoA en Isquémia de corazón.....	39
1.4.4 Papel de Malonil-CoA descarboxilasa en mitocondria	40
2. OBJETIVOS	43
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
3.1 Materiales	47
3.1.1 Lista de materiales y equipamiento utilizado en este trabajo	47
3.1.2 Páginas web utilizadas y servidores	48
3.2 Metodología.....	49
3.2.1 Clonaje de MCD.....	49
3.2.2 Mutagénesis de los residuos E302A, C206S, C243S y C206S/C243S	50
3.2.3 Expresión de MCD silvestre y mutantes	51
3.2.4 Preparación de MCD con medios de Seleniometionina	51

3.2.5 Purificación de MCD silvestre y sus variantes.....	52
3.2.6 Identificación y caracterización de la estabilidad de MCD en solución.....	53
3.2.7 Cristalización de MCD silvestre y marcada con SeMet.....	55
3.2.8 Recogida de datos, procesado y refinado de la estructura de MCD.....	56
3.2.9 Validación de MCD.....	57
3.2.10 Análisis en gel SDS no reductor de MCD y sus variantes pre-tratadas con H ₂ O ₂	57
3.2.11 Ensayos de actividad de MCD silvestre y mutantes.....	58
3.2.12 Ensayos de interacción de MCD con Pex5.....	59
4. RESULTADOS.....	63
4.1 Obtención de Malonil-CoA Descarboxilasa	63
4.1.1 Clonación, Expresión y purificación de MCD silvestre y mutantes	63
4.1.1 Análisis en solución de MCD.....	67
4.2 Cristalización de MCD y análisis preliminar de los datos.....	69
4.2.1 Cristales iniciales de MCD silvestre.....	69
4.2.2 Cristales con grupo espacial P1 de MCD SeMet.....	70
4.2.2 Cristales con grupo espacial P6 ₁ 22 de MCD SeMet	71
4.3 Obtención de fases iniciales	71
4.3.1 Procesado de datos	71
4.3.2 Búsqueda de átomos con SHELXC/D y obtención del modelo inicial de densidad electrónica	73
4.4 Extensión de fases de 4.35 Å a 3.29 Å y construcción del modelo inicial de proteína.....	76
4.4.1 Utilización de máscaras de densidad electrónica	76
4.4.2 Búsqueda de la solución en P1 por reemplazo molecular y construcción del modelo	77
4.5 Descripción general de la estructura de MCD y oligomerización.....	78
4.5.1 Nuevo plegamiento estructural en el dominio N-Terminal y dominio C-Terminal de la superfamilia de las GCN5-Histona N-acetiltransferasas.....	78
4.6 El centro activo de MCD.....	84
4.6.1 Comparación con la Histona N-acetiltransferasa GNAT, otra enzima con actividad malonil-CoA descarboxilasa en cyanobacterium Lyngbya	84
*Pie de figura en página anterior.....	89
4.7 Interacciones entre subunidades y enlaces disulfuro en MCD.....	90
4.7.1 Interacciones tipo I-II y interacciones tipo I-IV	90
4.7.2 Análisis de la formación de puentes disulfuro con la incubación de H ₂ O ₂ ...	90
4.8 Caracterización cinética de MCD y variantes mutadas.....	94

4.8.1 Ensayos de velocidad inicial con y sin pretratamiento de H ₂ O ₂	94
4.8.2 Implicaciones cinéticas del mutante E302G.....	96
4.8.3 Modelo de catálisis	97
4.9 Modelo de interacción de MCD con Pex5	98
4.9.1 Interacción de la parte C-Terminal de MCD con el receptor Pex5	98
5. DISCUSIÓN	103
6. CONCLUSIONES.....	111
7. ANEXO	115
8. BIBLIOGRAFÍA.....	124

Resumen

Este trabajo de tesis se engloba dentro de un proyecto de investigación que se inició en el laboratorio que dirige el Prof. Ignacio Fita del Instituto de Biología Molecular de Barcelona en colaboración con el grupo del Prof. Peter C. Loewen de la Universidad de Manitoba en Canadá. El proyecto tiene como finalidad el estudio estructural y funcional del proteoma peroxisomal, utilizando como modelos de estudio el proteoma humano y de levadura, con especial atención en las peroxinas, proteínas esenciales para el buen funcionamiento y desarrollo del peroxisoma.

Inicialmente se propusieron varios objetivos entre los cuales había la resolución estructural tridimensional mediante cristalografía de rayos-x de algunas peroxinas implicadas en el transporte de proteínas y también algunos enzimas claves del metabolismo del peroxisoma. Sin embargo, en el transcurso del tiempo, hemos visto reducido el número de proteínas diana objeto de estudio debido a problemas de expresión o solubilidad. Por ello, se continuó el estudio centrado básicamente en la estructura y cinética (realizado en el laboratorio del Prof. Joan C. Ferrer de la Universitat de Barcelona) de Malonil-CoA Descarboxilasa peroxisomal humana (MCD).

Malonil-CoA Descarboxilasa es un enzima que tiene un papel muy importante en la oxidación de ácidos grasos. Presenta dos isoformas y debido a sus características puede residir en diferentes compartimentos celulares, como el peroxisoma, citoplasma o mitocondria. En los tres compartimentos MCD está implicada de alguna forma en la vía metabólica de los ácidos grasos.

En peroxisoma, MCD descarboxila el malonil-CoA procedente de la beta oxidación de ácidos grasos. En citoplasma, MCD actúa junto a Acetil-CoA Carboxilasa, el enzima que sintetiza el malonil-CoA. Ambos se encargan de controlar la concentración del malonil-CoA citoplasmático, imprescindible para

la síntesis de ácidos grasos en células lipogénicas y también inhibidor de la Carnitina Aciltransferasa 1 (CPT1), el enzima que inicia el transporte de los ácidos grasos a la mitocondria para la Beta oxidación. Finalmente, MCD en mitocondria convierte el malonil-CoA (utilizado para la síntesis de ácidos grasos) en acetil-CoA.

La estructura cristalina de MCD resuelta a 3.29Å presenta una disposición oligomérica basada en un dímero de heterodímeros, con una fuerte asimetría entre los monómeros que forman el heterodímero sugiriendo reactividad "half-of-the-sites". Cada monómero está constituido por un dominio N-Terminal todo hélice y un dominio catalítico C-Terminal con plegamiento típico de la familia GCN5 Histona acetiltransferasa. Sin embargo, el lugar de unión de malonil-CoA en MCD, presenta una variación con respecto a sus homólogos. El cambio de un residuo glutámico (Glu302) por una glicina en el centro del motivo de unión que facilita la liberación del sustrato actuando como palanca molecular.

El tetrámero molecular parece ser la unidad funcional biológica, confirmado por cromatografía en gel filtración, en los cristales obtenidos con grupo espacial P6122 y P1 de MCD peroxisomal y en la estructura de MCD mitocondrial que fue liberada por un grupo de Oxford durante el proceso de construcción de MCD peroxisomal.

Cada heterodímero del tetrámero presenta una interfase de contacto hidrofóbica además de la posibilidad de formar un enlace disulfuro entre subunidades. Los heterodímeros están unidos entre sí por una pequeña superficie de contacto del dominio C-Terminal donde se exponen parejas de cisteínas, lo que hace de MCD una estructura tetramérica unida por superficies hidrofóbicas y con la posibilidad de unirse covalentemente mediante los puentes disulfuro.

Los estudios cinéticos han demostrado que MCD presenta diferentes comportamientos de eficiencia catalítica dependiendo de la formación de los puentes disulfuro, y además, confirmar que MCD tiene un comportamiento de cooperatividad negativa total, consistente con la reactividad "half-of-the-sites".

INTRODUCCIÓN

1. Introducción

1.1 Peroxisomas

La compartimentalización de los diversos orgánulos celulares ha ayudado a la especialización y diferenciación de las diferentes funciones a realizar dentro de la célula. Funciones tan importantes como degradación y síntesis de biomoléculas, transcripción y traducción de polipéptidos, están facilitados y son posibles gracias a la compartimentalización. Es en este aspecto, donde el peroxisoma tiene un papel decisivo sobre el metabolismo de los lípidos y degradación de peróxido de hidrógeno.

1.1.1 Visión general del peroxisoma

Los peroxisomas son pequeños orgánulos celulares formados por una membrana simple. Se encuentran distribuidos en todas las células eucarióticas y fueron inicialmente descubiertos por el Dr. Christian de Duve en 1966 como unas estructuras esféricas u ovoides de entre 0.1 – 1.5 μm de diámetro (Fig.1). El interior está formado por una matriz granular altamente concentrada. El número de peroxisomas depende de la actividad celular. Normalmente hay unos cientos de peroxisomas por célula en mamíferos (Lazarow, 2003). La membrana simple del peroxisoma es permeable a pequeñas moléculas como urato o glicolato debido a los poros proteicos insertados en ella que funcionan como canales. Sin embargo, la membrana constituye una barrera impermeable para solutos voluminosos tales como (NAD/H, NADP/H, CoA, y acetil/acil-CoA esters) (Antonenkov and Hiltunen, 2006). Esta característica de la membrana es propia del peroxisoma y la hace específica para sus funciones.

La variedad de funciones que lleva a cabo el peroxisoma son múltiples y relevantes para el buen mantenimiento fisiológico de la célula. De entre ellas, se encuentran funciones generales para todos los organismos como la eliminación de especies reactivas del oxígeno (ROS del inglés *reactive oxygen species*) y el

metabolismo de lípidos detallado más abajo. Sin embargo, se han descrito también funciones específicas de algunos organismos incluyendo: síntesis de penicilina en hongos y levaduras, glicólisis en protozoos, fotorespiración y ciclo del glioxilato en plantas, síntesis de colesterol y ácidos biliares en mamíferos y degradación de aminoácidos en hongos y mamíferos (Titorenko and Rachubinski, 2001). En el proceso de eliminación de especies reactivas del oxígeno actúan un conjunto de enzimas como son: catalasa, superóxido dismutasa (SOD1), glutatión transferasa (GSTK1), peroxiredoxinas (PRDX1 y PRDX5), que hacen del peroxisoma, un orgánulo especializado en detoxificar la célula de productos reactivos del oxígeno. Cuando alguno de los componentes de este complejo falla o funciona defectuosamente, pueden aparecer síntomas de envejecimiento celular, neurodegeneración y estrés oxidativo (Kregel and Zhang, 2007).

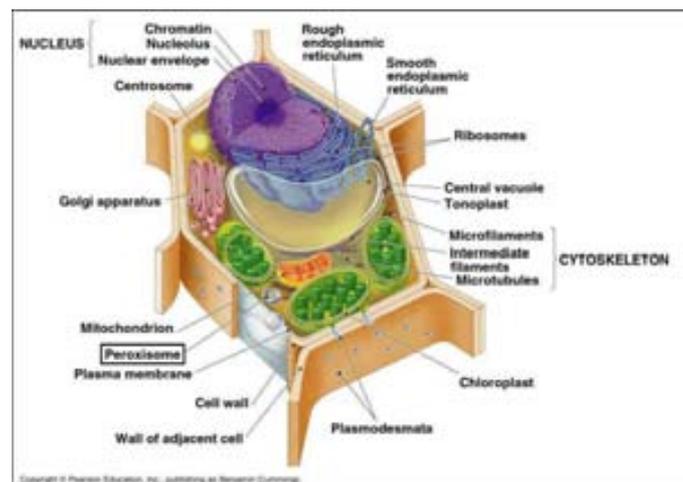


Fig.1 Representación de las subestructuras celulares.
 Extraído de Biology, N.Campbell and J. Reece 2008
 Pearson Education

Así pues, gracias al sistema antioxidante y la capacidad de control de metabolismo de lípidos, el peroxisoma es un orgánulo con gran relevancia dentro del contexto celular. En humanos, defectos en la biogénesis del peroxisoma o en alguna de sus vías metabólicas desemboca en las conocidas enfermedades peroxisomales (PBD del inglés *Peroxisome biogenesis disorders*). Tales enfermedades pueden ser de dos tipos. Las que afectan a alguna de las

proteínas denominadas peroxinas (PEX), o el segundo tipo de enfermedades, que son debidas a defectos en algún enzima peroxisomal. (Titorenko and Rachubinski, 2004). Las enfermedades peroxisomales más conocidas son el síndrome de Zellweger y Condrodisplasia puntata. Ambas enfermedades tienen unos cuadros sintomáticos graves, incluyendo retraso mental, problemas psicomotores, malformación y apoptosis de las neuronas (Powers and Moser, 1998).

1.1.2 Biogénesis del peroxisoma

Estudios iniciales hacían pensar que los peroxisomas eran orgánulos autónomos que se multiplicaban a partir del crecimiento y proliferación de peroxisomas preexistentes (Purdue and Lazarow, 2001). Sin embargo, investigaciones recientes evidencian que el retículo endoplasmático está también relacionado con la formación de peroxisomas (Tam et al., 2005; van der Zand et al., 2010). Estos resultados sugieren que la biogénesis del peroxisoma sigue dos vías diferentes (Fig.2) (Ma et al., 2011):

1) Formación de novo de los preperoxisomas desde el retículo endoplasmático (RE): Son muchos los estudios que indican que los preperoxisomas se producen mediante la formación de vesículas desde el retículo endoplasmático (Geuze et al., 2003; Schluter et al., 2006). Hay evidencias de que algunas de las proteínas de membrana peroxisomales son incorporadas desde el RE en la membrana de las vesículas que finalmente formaran los peroxisomas maduros sin la necesidad de mediación de los sistemas de transporte vesicular COPI y COPII (Voorn-Brouwer et al., 2001). Sería a partir de esta formación desde el RE, que se incorporarían las peroxinas de membrana (PMP) Pex3 y Pex19, las cuales reclutarán a las demás peroxinas para incorporarlas en el peroxisoma (Kunau, 2005).

2) División de peroxisomas preexistentes: La división de peroxisomas preexistentes normalmente se produce en estadios de maduración avanzados,

en los cuales peroxisomas ya formados proliferan por fisión. Pex11 es una de las peroxinas implicadas en la división. Las peroxinas necesarias son sintetizadas en los ribosomas libres del citoplasma e incorporadas al peroxisoma después de su división (Fig.2) (Erdmann, 2005)

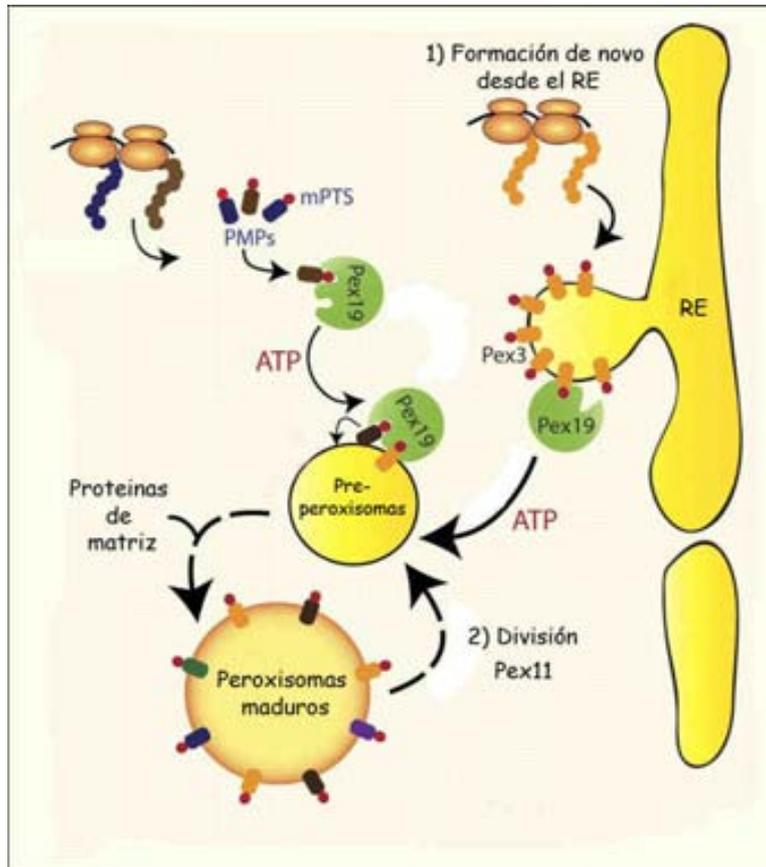


Fig.2 Diferentes rutas conocidas para la biogénesis del peroxisoma. 1) Formación de novo desde el retículo endoplasmático. 2) División a partir de peroxisomas maduros. Ambas rutas comparten la producción de proteínas desde los ribosomas libres en el citoplasma. La diferencia reside en que en la formación de novo, las proteínas son transportadas hacia el RE, sin embargo, en el proceso de división, las proteínas son incorporadas a los preperoxisomas (Adaptado de Ma et al., 2011).

La regulación del control de proliferación y división de los peroxisomas es un proceso complejo en el que no se han determinado con exactitud todos los elementos que están involucrados, aunque algunos estudios demuestran que el factor de transcripción proliferador de peroxisoma activado por receptor alfa (PPAR α) está implicado via activación de genes que codifican para algunos enzimas clave en el metabolismo del peroxisoma (Finck, 2007).

1.1.3 Peroxinas (Pex)

Tanto la biogénesis del peroxisoma como el funcionamiento y mantenimiento del mismo están vinculadas estrechamente con las peroxinas (Tabla.1). Las peroxinas están codificadas por los genes PEX y sintetizadas en los ribosomas. Posteriormente, como ya hemos visto, serán incorporadas a los preperoxisomas o enviadas al retículo endoplasmático para insertarlas en vacuolas que finalmente se convertirán en peroxisomas maduros. Las peroxinas se localizan en la matriz del peroxisoma o en las membranas.

Tabla 1. Lista de características y funciones de las peroxinas

Gen	Organismo	Características estructurales	Función
Pex1	Humano	AAA ATPasa	Reciclaje de Pex5 dependiente de ATP
Pex2	Humano	Dedo de zinc	Translocación?
Pex3	Humano	Dominio SH3	Fijar Pex19 a membrana
Pex4	Hongo	Ubc	Mono ubiquitinación Pex5
Pex5	Humano	Motivo WxxxF/Y, region TPR	Receptor PTS1
Pex6	Humano	AAA ATPasa	Reciclaje de Pex5 dependiente de ATP
Pex7	Humano	Motivo WD40	Receptor PTS2
Pex8	Levadura	Dominio cremallera leucina	Unión complejo captador-complejo dedo de zinc
Pex9	Hongo	Desconocido	Desconocida
Pex10	Humano	Dedo de zinc	Translocación?
Pex11	Humano	Desconocido	División peroxisomas
Pex12	Humano	Dedo de zinc	Translocación?
Pex13	Humano	Dominio SH3	Interacción con Pex5 y Pex7
Pex14	Humano	Motivo PxxP	Interacción con Pex5 y Pex7
Pex15	Levadura	Desconocido	Fijación de Pex6 a la membrana
Pex16	Humano	Desconocido	Desconocido
Pex17	Levadura	Desconocido	Ayuda en interacción de Pex13 y Pex5
Pex18	Levadura	Motivo WxxxF/Y	Coreceptor de PTS2
Pex19	Humano	Caja CAAAX	Fijación proteínas de membrana
Pex20	Hongo	Motivo WxxxF/Y	Coreceptor PTS2
Pex21	Levadura	Motivo WxxxF/Y	Coreceptor PTS2
Pex22	Levadura	Desconocido	Fijación de Pex4 a la membrana
Pex23	Levadura	DysF	Regulación del crecimiento
Pex24	Levadura	Desconocido	Separación peroxisomas
Pex25	Levadura	Desconocido	Elongación peroxisomas
Pex26	Humano	Desconocido	Fijación de Pex6 a la membrana
Pex27	Levadura	Desconocido	Elongación peroxisomas
Pex28	Levadura	Desconocido	Separación peroxisomas
Pex29	Levadura	Desconocido	Regulación del crecimiento
Pex30	Levadura	DysF	Regulación del crecimiento
Pex31	Levadura	DysF	Regulación del crecimiento
Pex32	Levadura	DysF	Regulación del crecimiento

1.2 Importación de proteínas a la matriz peroxisomal

Para llevar a cabo la importación de proteínas a la matriz peroxisomal, el peroxisoma dispone de un complejo sistema de proteínas transportadoras que

están involucradas en la carga, internalización de proteínas y recirculación de los transportadores del interior al exterior del peroxisoma. Además, dependiendo del grado de ubiquitinación una vez se ha liberado la carga en el interior del peroxisoma, los transportadores son enviados al proteosoma para ser degradados o volver a un nuevo ciclo de transporte (Platta and Erdmann, 2007).

1.2.1 Secuencias señal de importación a la matriz peroxisomal

Debido a que el peroxisoma no tiene ADN propio y no puede sintetizar las proteínas en su interior, las proteínas son sintetizadas en el citosol e incorporadas en el peroxisoma mediante dos secuencias señal, PTS1 y PTS2 (del acrónimo inglés *Peroxisomal targeting signal*).

La secuencia señal PTS1 consiste en el tripéptido serina-lisina,leucina (SKL) de las proteínas o enzimas a transportar. Esta secuencia señal es la más abundante y se encuentra en la mayoría de proteínas de la matriz. Es la más conservada evolutivamente, aunque estudios recientes han determinado que la secuencia señal de interacción PTS1 puede contener hasta 9 residuos adicionales, además de los tres correspondientes SKL y variantes, de la región C-terminal necesarios para el reconocimiento de Pex5 (Neuberger et al., 2003). La proteína receptora citosólica Pex5, reconoce la secuencia señal PTS1 de las proteínas que han de ser transportadas al peroxisoma (Otera et al., 2002). Pex5 contiene un dominio altamente conservado en el C-terminal compuesto por 7 motivos tetratricopéptidos (TPR del acrónimo inglés *Tetratricopetides repeats*). La interacción del dominio TPR con las secuencia señal PTS1 genera un cambio conformacional de la conformación abierta a cerrada dependiendo de si hay interacción o no con la secuencia señal PTS1 (Stanley and Wilmanns, 2006). Además, la región N-terminal de Pex5 contiene 7 repeticiones del motivo WxxxF/Y pentapéptido. Estos motivos están involucrados en la unión a dos de

las peroxinas del complejo captador Pex13 y Pex14 de la membrana peroxisomal (Otera et al., 2002).

PTS2 es una secuencia señal encontrada en la región N-terminal de algunas proteínas como 3-Ketoacyl-CoA tiasa, involucrada en la beta oxidación peroxisomal (Swinkels et al., 1991). La secuencia PTS2 está caracterizada por el nonapéptido (R/K)(L/V/I)X₅(H/Q)(L/A) sensible a digestión. Es una secuencia señal menos común y parece ser que tiene un funcionamiento de transporte parecido al mostrado por PTS1. El receptor asociado a esta secuencia señal es Pex7 (Mukai and Fujiki, 2006).

1.2.2 Maquinaria de importación hacia el peroxisoma

Una vez los receptores Pex5 o Pex7 han realizado la unión de las proteínas diana, el transporte hacia la matriz es mediado a través de un complejo de proteínas ancladas en la membrana denominado importómero. El importómero está formado por diferentes complejos proteicos anclados en la membrana que están involucrados en la captación, translocación y reciclado de los receptores (Platta and Erdmann, 2007). El importómero consta de dos complejos diferentes unidos por Pex8 y otras peroxinas adicionales que forman el complejo de reciclado de los receptores (Fig.3).

El primer subcomplejo proteico, formado por Pex13, Pex14 y Pex17 está clasificado como la unidad de interacción para los receptores Pex5 y Pex7 (Rayapuram and Subramani, 2006). Pex13 y Pex14, interactúan entre sí y también con Pex5 y Pex7 (Albertini et al., 1997). Pex13 contiene un dominio homólogo a Src (SH3), el cuál está provisto de un lugar de unión para el motivo PXXP de Pex14 y el motivo WxxxF/Y de Pex5 (Pires et al., 2003). Se cree que ambas peroxinas (Pex13, Pex14) inician el proceso de interacción con los receptores Pex5 y Pex7 (Platta and Erdmann, 2007). Pex17 es una proteína

periférica de membrana de función desconocida que se asocia con Pex14 (Rayapuram and Subramani, 2006).

El segundo subcomplejo proteico, está compuesto de tres proteínas de membrana, Pex2, Pex10 y Pex12, cada una de ellas dotadas con un dominio dedo de zinc. La función del complejo dedo de zinc no se ha elucidado hasta la fecha, pero se le han asignado posibles funciones de translocación (Chang et al., 1999) y reciclado de los receptores (Dodt and Gould, 1996).

El importómero también incluye peroxinas individuales, tales como Pex8 o Pex3, que unen el complejo de interacción y el complejo con dominio tipo dedo de zinc (Meinecke et al., 2010). Otra función que se le asigna al importómero es el reciclado de los receptores hacia el citosol (Collins et al., 2000). La maquinaria de reciclado consiste en un conjunto de peroxinas ancladas a la membrana y de otras asociadas a ella. Pex22, junto a Pex15 en levaduras y Pex26 en mamíferos, se encargan de enviar de vuelta los receptores al citosol para una nueva ronda de importación o degradación, dependiendo del grado de ubiquitinación aplicado por parte de Ubc4 y Pex4 (Fig3). Ambas peroxinas, Pex15 y Pex26, tienen capacidad de unir el dominio N-terminal de Pex6 (Birschmann et al., 2003). Pex6 y Pex1 forman el único conjunto de peroxinas ATPasas del importómero. Ambas peroxinas son necesarias para el reciclaje de receptores y también para el funcionamiento general del importómero gracias a su capacidad de actuar como chaperonas ayudando en la disociación de complejos (Shiozawa et al., 2004).

A través de una serie de interacciones coordinadas, los receptores envían sus respectivas moléculas carga hacia el importómero y son continuamente enviados de vuelta al citosol para consiguientes rondas de importación-exportación a través de la maquinaria de reciclaje. Este proceso, ha de estar fuertemente regulado para un funcionamiento normal del peroxisoma. Recientes estudios en mamíferos han mostrado que la pérdida de alguno de los

componentes del importómero está caracterizada por la deslocalización de las proteínas de la matriz en el citosol de la célula (Purdue and Lazarow, 2001).

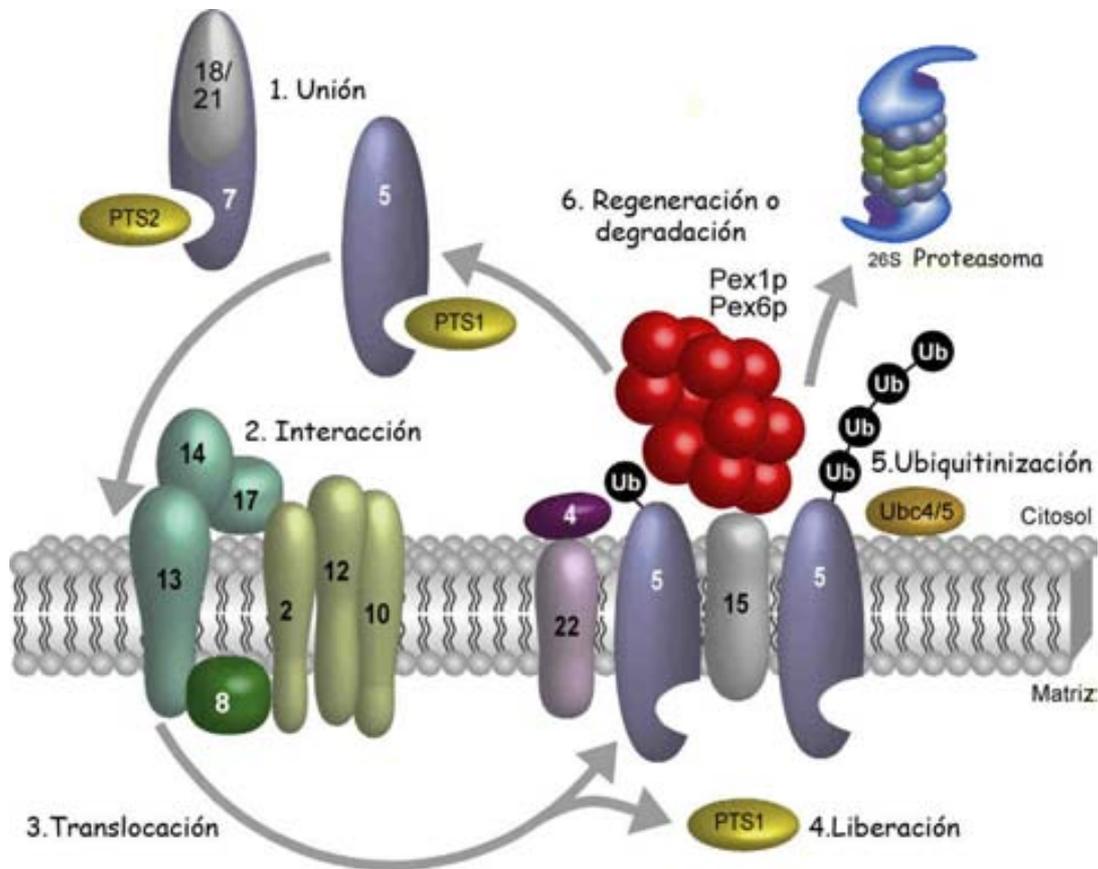


Fig.3 Esquema de un ciclo de importación y reciclaje de la maquinaria de importación del peroxisoma dividido en 5 pasos. 1) Unión receptor-carga en el citosol. 2) Interacción de los receptores con el complejo de interacción Pex13, Pex14, Pex17. 3) Translocación del complejo receptor-carga a la matriz mediado por Pex2, Pex10 y Pex12. 4) Liberación de la carga dentro del peroxisoma. 5) Monoubiquitinación o poliubiquitinación de los receptores. 6) Regeneración del receptor (Monoubiquitinación) o degradación (Poliubiquitinación). (Adaptado de Harald Platta and Ralf Erdmann, 2007)

1.2.3 Liberación de proteínas peroxisomales

Varias hipótesis han descrito el mecanismo por el cual las proteínas de matriz son liberadas en el lumen peroxisomal, sin embargo estas hipótesis siguen sin ser verificadas. Uno de los modelos, predice que un gradiente de pH podría ser el responsable de la disociación entre el receptor y la carga. La acidificación de la cara citosólica del importómero es la hipótesis que cobra más fuerza para mediar este proceso (Meinecke et al., 2010). Este modelo está basado en hallazgos iniciales en levaduras, que predicen que el estado

oligomérico de Pex5 del complejo receptor-carga puede cambiar dependiendo del pH, resultando en un complejo monomérico disociado a pH 6 y un complejo dimérico unido a pH 7.2 (Wang et al., 2003).

Otra de las hipótesis se respalda en unos estudios que revelan una mayor afinidad de Pex13 por receptores libres que por receptores con carga, lo que provocaría la disociación. Lo mismo ocurre con Pex14, parece ser que la interacción Pex5-PTS1 es más débil en presencia de la interacción de Pex14 (Ma et al., 2011; Ma and Subramani, 2009) .

Otra de las posibles hipótesis en levadura consiste en la interacción de la región PTS1 por parte de Pex8 con Pex5, posibilitando así la disociación del complejo Pex5-Cargo (Ma et al., 2011; Ma and Subramani, 2009).

1.2.4 Regeneración cíclica de receptores PTS y ubiquitinación

Si los receptores PTS entran en el peroxisoma, es obvio que necesitan de señales y proteínas específicas para el reciclado de vuelta hacia el citosol (Dammai and Subramani, 2001). Recientemente, se ha identificado un residuo Cisteína cerca de la región N-terminal de Pex5 necesario para el reciclado de receptores en levaduras y mamíferos (Grou et al., 2008; Williams et al., 2007). La delección de los residuos 1-17 de la región N-terminal, que contienen el residuo Cisteína de la peroxina humana Pex5, conlleva la pérdida del reciclaje desde el peroxisoma hasta el citosol (Costa-Rodrigues et al., 2004; Oliveira et al., 2003), sugiriendo un rol importante de la cisteína en el reciclado del receptor Pex5.

El paso de exportación del receptor enviaría Pex5 hacia la cara citosólica de la membrana peroxisomal en un estado libre de la carga. Es lógico pensar que este estado libre del receptor PTS1 que ha completado una ronda de importación hacia el lumen ha de tener una conformación diferente del receptor PTS1 citosólico unido a carga. Diferentes estudios demuestran que Pex5 libre

está en estado de oligomerización tetramérico (Madrid et al., 2004; Wang et al., 2003) mientras que en presencia de la carga es dimérico (Madrid et al., 2004; Titorenko et al., 1998). Además, el complejo que se forma entre Pex8 y Pex5 es 1:1 así que aparecería también la forma monomérica para el estado del receptor una vez ha liberado la carga en el citosol (Madrid et al., 2004; Titorenko et al., 1998).

Una vez Pex5 está insertado en la membrana peroxisomal será marcado con ubiquitina por el enzima E2 Pex4 (Fig3) (Kiel et al., 2005; Platta et al., 2004; Williams et al., 2007), que se mantiene periférico en la membrana unido a Pex22 (Koller et al., 1999). Una vez Pex5 es monoubiquitinada, es reconocida mediante mecanismos desconocidos por las AAA ATPasas, Pex1 y Pex6 asociadas con Pex15 en levaduras y Pex26 en mamíferos . Estas ATPasas usan la hidrólisis del ATP para empujar los receptores hacia el citosol (Platta et al., 2005). El último paso de reciclado debería comportar la desubiquitinación y oligomerización del receptor PTS, aunque todavía no se conoce como se produce este paso.

En ausencia de uno o más componentes de la maquinaria de reciclaje (Pex1, Pex4, Pex6, Pex22, y Pex15/26) una lisina situada cerca del extremo N-terminal de Pex5 es poliubiquitinada por el sistema RADAR (Kiel et al., 2005; Leon et al., 2006; Platta et al., 2004) . Este proceso de poliubiquitinación utiliza un enzima diferente, en este caso es Ubc4/5 (Williams et al., 2008). El efecto de la poliubiquitinación es la degradación del receptor PTS mediante el proteosoma (Fig.3).

1.3 Funciones fisiológicas del peroxisoma

El peroxisoma pertenece, junto a los glioxisomas y glicosomas, a la familia de los microcuerpos celulares. Representan una clase de organismos ubicuos y esenciales, caracterizados por la presencia de una matriz proteínosa envueltos de una membrana simple. Desde su descubrimiento en 1966 por De Duve, el conocimiento bioquímico de los peroxisomas se ha incrementado

substancialmente debido a un número de razones diferentes. Primero, la identificación y caracterización de mutantes de levadura con problemas en la biogénesis del peroxisoma han ayudado a determinar los principales componentes de estas estructuras celulares. Este conocimiento gracias a otros enfoques más clásicos, como purificación de proteínas, han consolidado la identificación de una serie de proteínas y enzimas peroxisomales. Segundo, el reconocimiento de una amplia clase de enfermedades genéticas en humanos que relacionan algunos aspectos de la biogénesis del peroxisoma y la funcionalidad del mismo ha puesto en evidencia el rol metabólico de los peroxisomas en humanos. Como resultado de estos estudios combinados, sabemos que la beta oxidación de ácidos grasos es una ruta metabólica general de todos los tipos de peroxisomas y que los peroxisomas de los eucariotas superiores, incluyendo los humanos, catalizan un gran número de funciones peroxisomales como biosíntesis de plasmalógenos, degradación de especies reactivas o degradación de aminoácidos (Wanders and Waterham, 2006).

1.3.1 Biosíntesis de plasmalógenos

Los plasmalógenos són glicerofosfolípidos en los que una de las dos cadenas acil esta unida al glicerol (Fig.4). Se producen por la unión de fosfolípidos con el grupo 1-O-alkilo de un acido graso, mediante un enlace éter, y normalmente contienen un grupo polar etanolamina o colina (Fig.4). Hasta el momento, no se ha determinado con exactitud la función fisiológica de los plasmalógenos, aunque algunos estudios indican que están implicados en dinámica de membranas, señalización intracelular, transporte de colesterol, estrés oxidativo y metabolismo de ácidos grasos (Nagan and Zoeller, 2001; Zoeller et al., 1988)

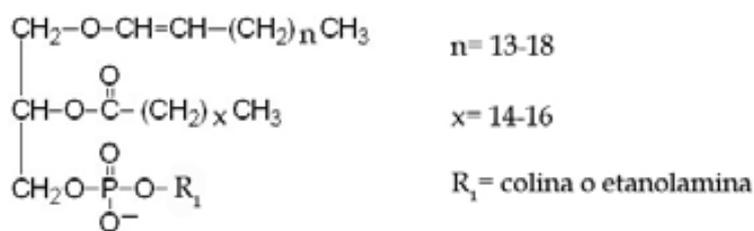


Fig.4 Composición química de los plasmalógenos. La longitud del grupo alqueno, n puede variar de 13 a 18. La cadena del ácido graso puede contener de 14 a 16 carbonos. El grupo R₁ determina el tipo de plasmalógeno.

En humanos, los plasmalógenos constituyen un 18% del total de la masa de fosfolípidos y muestran una distribución celular y tisular específica. Los niveles más elevados de plasmalógenos con cabeza polar etanolamina se producen en cerebro, corazón, pulmones, riñones, bazo, músculo esquelético y genitales, mientras que los plasmalógenos con cabeza colina son producidos en mayor proporción en corazón y músculo esquelético, con bajos niveles en los demás órganos.

Macrófagos y neutrófilos contienen altos niveles de plasmalógenos, normalmente usados para producir el factor activador de plaquetas. La posición sn-1 de los plasmalógenos es habitualmente ocupada por alcoholes grasos de cadena C16:0, C18:0 y C18:1, mientras que la posición sn-2 es usualmente ocupada por ácidos grasos poliinsaturados (Wanders and Waterham, 2006).

La biosíntesis de los plasmalógenos requiere, a parte de otros enzimas localizados en el citosol, de tres enzimas peroxisomales que se detallan a continuación. El primer paso para la biosíntesis de los plasmalógenos conlleva la transferencia de un grupo acilo al compuesto dihidroxiacetona fosfato (DHAP) mediante la actuación del enzima dihidroxiacetona phosphato acil transferasa (DHAPAT o también denominada GNPAT) (Fig.5) (Nagan and Zoeller, 2001). El enzima solo puede transferir un pequeño rango de Acyl-CoAs, incluyendo los saturados (C14:0) y (C16:0) y los insaturados (C18:1) (Ofman and Wanders, 1994). El segundo paso, también llevado a cabo en el peroxisoma es la sustitución del grupo acilo por un alcohol de cadena larga mediante el enzima

alquil-DHAP sintasa (AGPS). Ambos enzimas configuran un complejo heterotrimérico proteico de 210 kDa asociado a membrana (Thai et al., 1997) (Biermann et al., 1999). El tercer y último paso producido en el peroxisoma lo realiza el enzima alquilo-DHAP oxidoreductasa. Mutaciones en los genes GNPAT o AGPS son causantes de una de las conocidas PBD denominada Condrodisplasia Puntata (Datta et al., 1990).

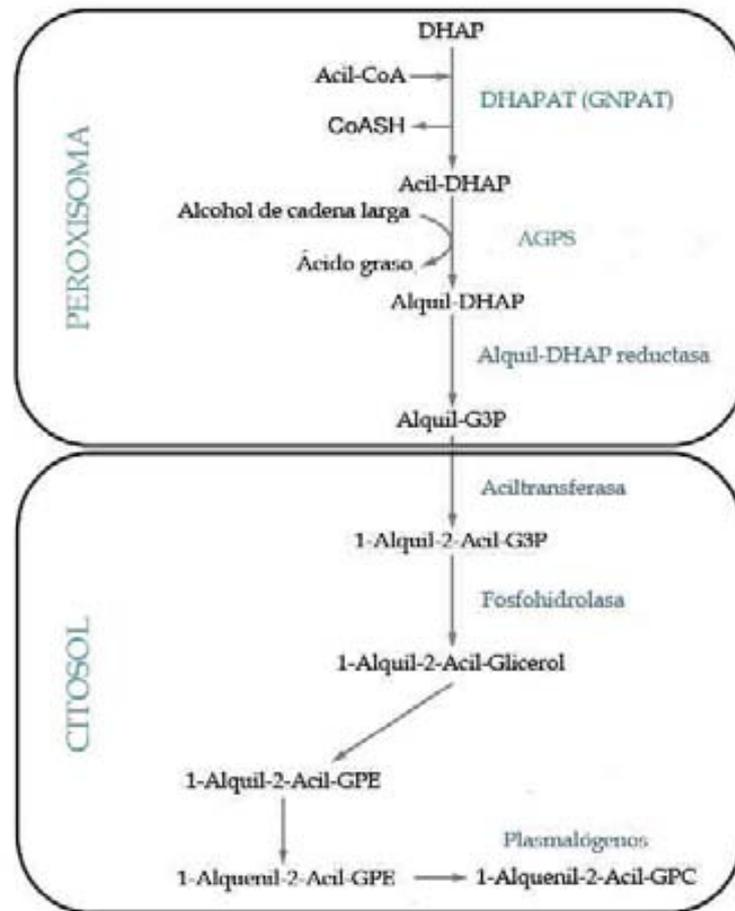


Fig.5 Esquema de la síntesis de plasmalógenos. Tanto GNPAT como AGPS són dos enzimas vitales para el proceso de beta-oxidación de ácidos grasos en peroxisomas. Mutaciones en los genes de GNPAT o AGPS són causantes de las PDB. (Wanders and Waterham, 2006)

1.3.2 Metabolismo de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Algunas reacciones metabólicas que se dan en diferentes compartimentos celulares tales como mitocondria, retículo endoplasmático y peroxisomas conllevan el consumo de oxígeno. Aunque a diferencia de la mitocondria, en el peroxisoma, la β -oxidación de ácidos grasos no está acoplada a la fosforilación

oxidativa. Sin embargo, otro tipo de mecanismo no tan especializado como la cadena de transporte electrónico de la mitocondria, extrae electrones de algunos metabolitos para reducir el oxígeno molecular, produciendo algunas especies reactivas de oxígeno (ROS) tales como peróxido de hidrógeno (H_2O_2), anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el radical hidroxil ($\cdot OH$) (Antonenkov et al., 2009; De Duve and Baudhuin, 1966).

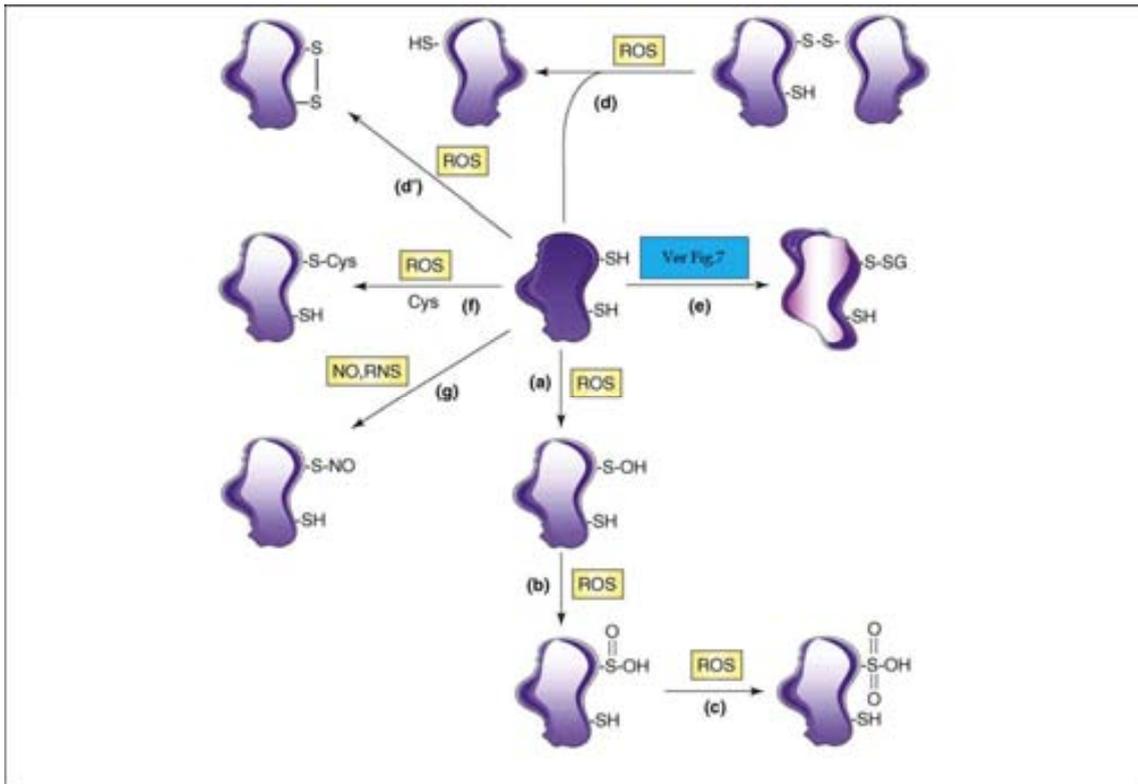


Fig.6 Cambios redox producidos por ROS a) formación de sulfénico, b) formación de sulfínico, c) formación de sulfónico, d) rotura de un puente disulfuro intermolecular, d') formación de un puente disulfuro intramolecular, f) adición de una cisteína, g) Unión de óxido nítrico (Dalle-Donne et al., 2009)

Algunos estudios, demuestran que bajas concentraciones de ROS sirven de señalización celular secundaria via modificaciones reducción-oxidación. Normalmente, las modificaciones redox ocurren en residuos cisteína, sin embargo, residuos como el triptófano, tirosina, y histidina también pueden sufrir cambios similares (Fig.6 y 7). Los tioles de las cisteínas están sujetas a diferentes grados de oxidación por diferentes ROS resultando en la producción de ácido sulfénico (SOH), ácido sulfínico (SO₂H) o ácido sulfónico (SO₃H). Las dos últimas especies son irreversibles, pero la especie SOH puede ser

modificada con la adición de un grupo glutatión (Fig.6 y 7). Estas modificaciones postraduccionales están implicadas en estrés oxidativo, estrés nitrosativo y control de la señalización celular (Dalle-Donne et al., 2009). Además los grupos SOH también pueden reaccionar con otras cisteínas inter o intra molecularmente para formar puentes disulfuro.

La variedad de moléculas sensibles a modificaciones oxido-redox contienen fosfatasas, quinasas, un gran número de factores de transcripción y otras proteínas como las metaloproteinasas (Paulsen and Carroll, 2009). Sin embargo, es conocido que niveles elevados de estas moléculas reactivas pueden ejercer daño celular a través de la oxidación de macromoléculas biológicas llegando así a romper el estado redox de la célula. Las ROS, pueden alterar la actividad de proteínas a través de varias respuestas biológicas, incluyendo, expresión de genes, proliferación celular, angiogénesis, muerte celular y senescencia (Waris and Ahsan, 2006).

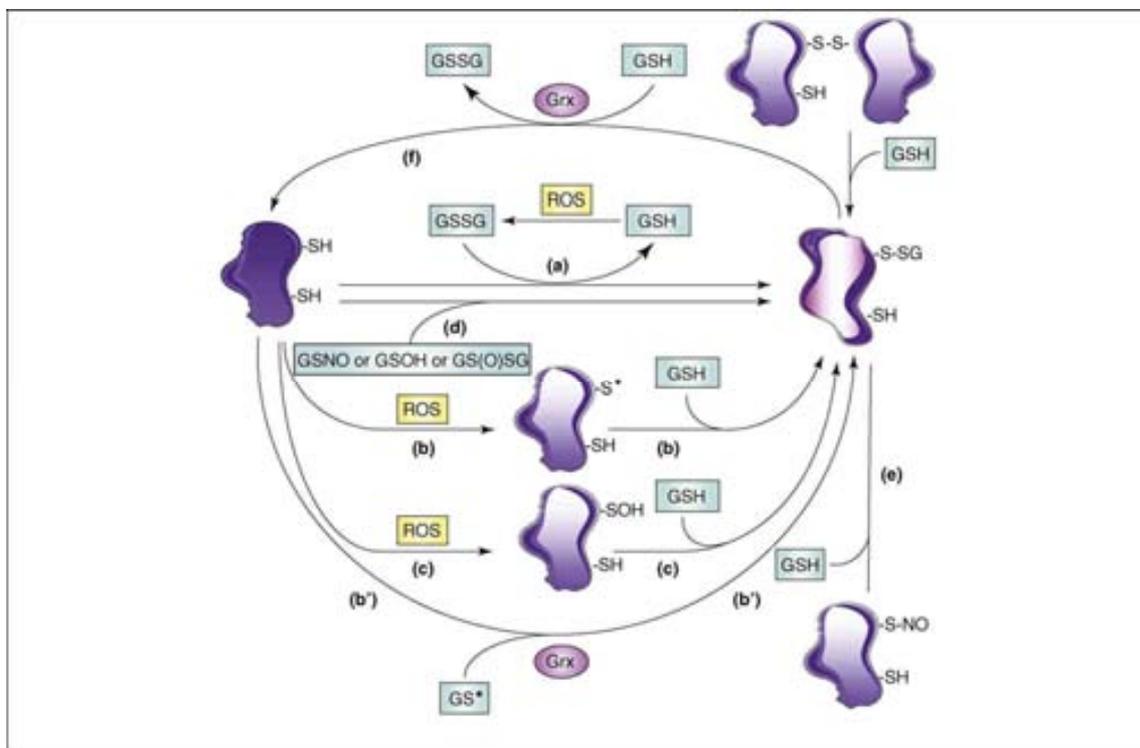


Fig.7 Diferentes modificaciones redox mediante el glutatión a) A un grupo tiol b) A un radical tiol, b') Mediante Grx, c) A un sulfénico, d) A un grupo tiol, e) A un grupo tiol unido a ácido nítrico, f) A un tiol con glutatión (Dalle-Donne et al., 2009)

Estos resultados, confirman que el peroxisoma juega un rol muy importante en la producción y degradación de especies reactivas de oxígeno. La función más destacada de los peroxisomas es la degradación de H₂O₂ a agua y oxígeno mediante la catalasa. En este contexto es interesante apuntar que defectos en el funcionamiento de la catalasa pueden producir daño isquémico, hipertensión, enfermedad de la retina, enfermedades neurodegenerativas y la iniciación y progresión de ciertos cánceres (Koepke et al., 2008).

La regulación de las ROS producidas en los peroxisomas involucra también múltiples enzimas y compuestos antioxidantes, además de la catalasa. La vitamina A, E y el GSH actúan como antioxidantes biológicos, la Superóxido dismutasa, la glutatión transferasa y una variedad completa de Glutatión peroxidasas y Peroxiredoxinas son los enzimas complementarios a todo el sistema de reciclado de especies reactivas de oxígeno (Singh, 1996).

1.3.3 ROS en desarrollo animal y señalización Wnt

Algunos procesos de desarrollo animal son realizados en condiciones anaeróbicas, mientras que otros son dependientes de especies ROS. La distribución espacio-temporal de las ROS varía a través de las diferentes etapas de desarrollo en diferentes organismos. En mamíferos, tanto el período preimplantacional y postimplantacional de la embriogénesis ocurre bajo condiciones casi anaeróbicas, y cualquier condición de estrés oxidativo puede ser determinante en el desarrollo embriogénico (Hernandez-Garcia et al.). Niveles elevados de ROS son letales para el crecimiento de cultivos embrionarios, y la administración de compuestos que facilitan la eliminación de radicales libres mejora el desarrollo embrionario *in Vitro* (Covarrubias et al., 2008). Procesos vitales como desarrollo de la espermatogénesis, oogénesis, fertilización, morfogénesis, angiogénesis y migración celular están vinculados al estado redox de algunas proteínas (Fig.7) (Covarrubias et al., 2008). Por ejemplo, bajos niveles de peróxido de hidrógeno producen un estado de

supervivencia celular, mientras que niveles elevados de peróxido de hidrógeno promueven apoptosis (Sablina et al., 2005).

Otro proceso regulado por el estado redox de las células es la señalización Wnt. Las proteínas Wnt están consideradas como moléculas esenciales para el desarrollo animal. El rol de las proteínas Wnt son variados tanto en embriogénesis como proliferación y diferenciación (Clevers, 2006). La señalización por Wnt consiste en la acumulación de β -catenina y su translocación hacia el núcleo, para activar el factor de transcripción Tcf. El proceso requiere de una proteína celular que se denomina Dishevelled (Dv1). Dv1 a su vez, puede ser inactivada por la unión de NrX en su estado reducido y suprimir así la señalización Wnt (Funato et al., 2006). NrX es sensible a oxidación mediante peróxido de hidrógeno y así disociar el complejo Dv1-NrX para activar de nuevo la transcripción mediante el factor de transcripción Tcf. Teniendo en cuenta estos resultados, se puede deducir que los niveles de ROS son determinantes en la activación de la señalización Wnt y en consecuencia, el correcto desarrollo celular.

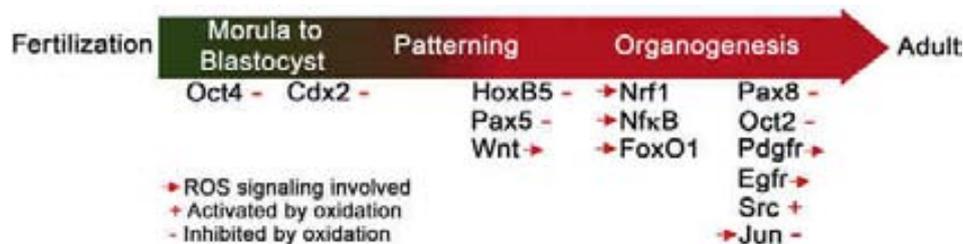


Fig.7 Regulación redox de algunas proteínas importantes en desarrollo celular. La Inhibición (-) y activación (+) puede resultar de la oxidación directa de alguna proteína. La señalización mediada por ROS puede activar (flecha en la izquierda) o desactivar (flecha en la derecha) la proteína y determinar su actividad. El esquema muestra algunas proteínas que se han demostrado genéticamente que tienen funciones en desarrollo celular y que su actividad puede ser regulada por ROS. La flecha representa el desarrollo embriionario desde estadios metabólicos anaeróbicos (verde) a estadios oxidativos (rojo). (Covarrubias et al., 2008)

1.3.4 Degradación de aminoácidos-proteínas

Los peroxisomas de mamíferos contienen varias oxidasas con funciones de degradación de aminoácidos. La D-aminoácido oxidasa tiene capacidad de oxidar los D-isómeros de los aminoácidos neutros y básicos, así como la D-

aspartato oxidasa, es también capaz de oxidar los D-isómeros de los aminoácidos ácidos (Van Veldhoven et al., 1991). La oxidación de aminoácidos por parte de ambas enzimas produce, cetoácidos, amonio y peróxido de hidrógeno. Los peroxisomas también están involucrados con la oxidación de algunos L-aminoácidos, como por ejemplo la L-lisina, que puede ser degradada a ácido L-2-amino adípico por la vía metabólica del L-pipecolato. La L-pipecolato oxidasa, que normalmente oxida L-pipecolato a 1-piperidina-6-carboxilato, es una enzima peroxisomal identificada en humanos (Wanders et al., 1989) y en hígado de mono (Mihalik et al., 1991), y es una proteína típica PTS1. El L-pipecolato es acumulado en líquidos y fluidos de pacientes que tienen falta de peroxisomas.

Lisina, hidroxilisina y triptófano pueden ser convertidos a glutamyl-CoA, y posteriormente ser oxidados mediante glutamyl-CoA oxidasa (Van Veldhoven et al., 1992)

1.3.5 Beta oxidación de ácidos grasos

La β -oxidación de ácidos grasos de cadena muy larga (>22) (VLCFA *del inglés very long chain fatty acids*) y cadena larga (13-21) (LCFA) es un proceso catabólico que se produce principalmente en los peroxisomas a diferencia de la mitocondria, que tiene capacidad únicamente de oxidar ácidos grasos de cadena larga. Existen otras diferencias entre la beta oxidación del peroxisoma y la mitocondria. Por ejemplo, la beta oxidación de la mitocondria está acoplada a la fosforilación oxidativa de la cadena de transporte electrónico, con lo cual, algunos subproductos de la beta oxidación como el FADH₂ y NADH son utilizados para la síntesis de ATP. Además el producto final de la beta-oxidación en la mitocondria, el acetil-CoA, es introducido en el ciclo de Krebs para seguir con la producción de ATP y poder reductor en forma de FADH₂ y NADH (Wanders and Waterham, 2006).

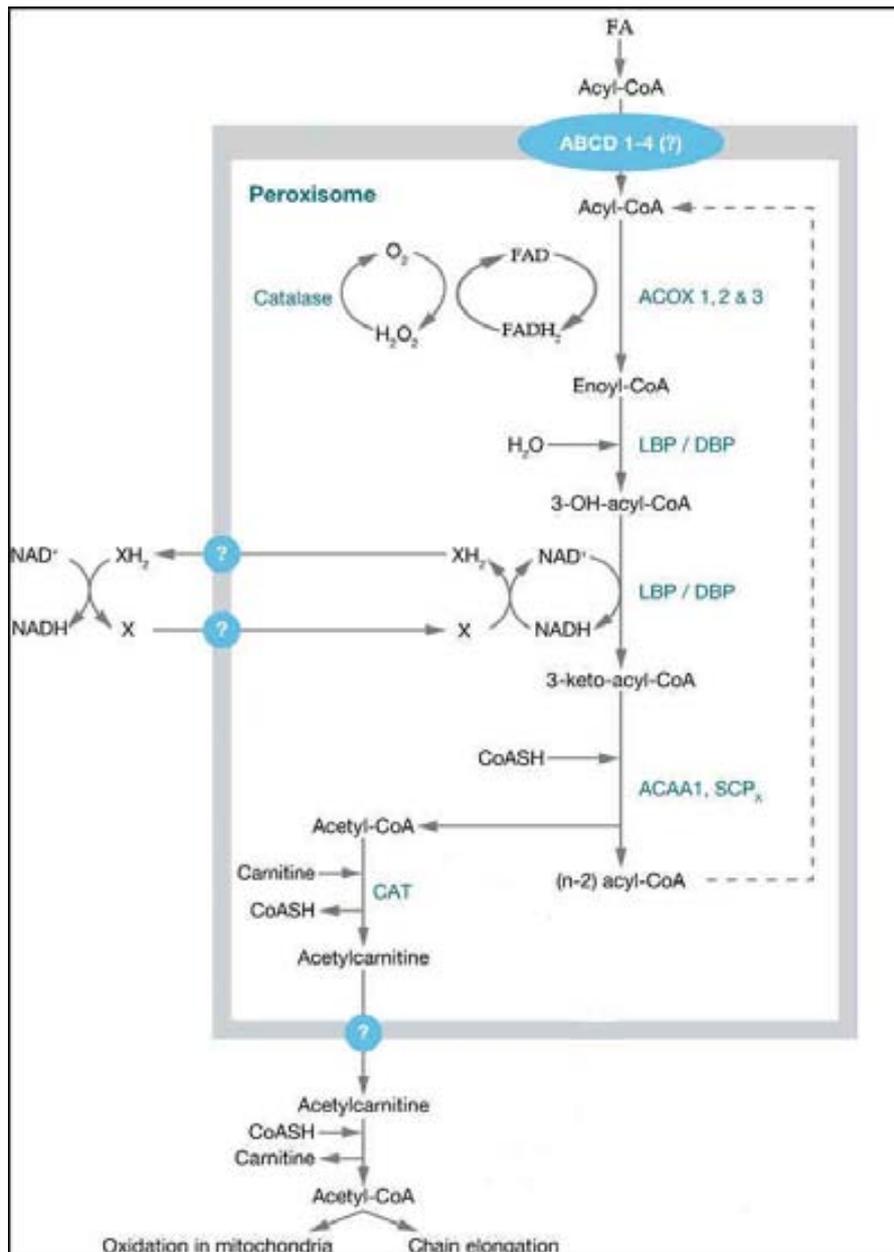


Fig.8 Beta oxidación en peroxisoma. La internalización de los ácidos grasos se producen por los transportadores ABCD1-4. El primer paso de la beta oxidación lo produce ACOX1, el enzima bifuncional LBP/DBP oxida el grupo alcohol del acil-CoA en una cetona. Los dos pasos finales implican la tiolasa ACAA1 y la Carnitina transferasa que iniciará el transporte hacia el citoplasma. (Wanders and Waterham, 2006)

Aunque el peroxisoma no está acoplado a la fosforilación oxidativa, si que existe un transporte de electrones desde FADH₂ hacia el oxígeno (Fig.8). Este transporte, denominado respiración peroxisomal, es utilizado para oxidar el oxígeno hacia peróxido de hidrogeno (De Duve and Baudhuin, 1966). Los productos finales de la beta oxidación peroxisomal són el acetil-CoA y NADH (Poirier et al., 2006). El Acetil CoA será utilizado en plantas para la

gluconeogénesis. En mamíferos se exportará hacia el citosol mediante transporte acoplado a carnitina, y una vez en el citosol, se utilizará para sintetizar ácido palmítico de cadena larga, o se reenviará a la mitocondria para que entre en el ciclo de krebs (Jakobs and Wanders, 1995; Saggerson, 2008).

El primer paso de la beta oxidación en mamíferos es catalizada por diferentes acyl-CoA oxidasas, con diferencias importantes entre la de rata y humano. Los peroxisomas extra hepáticos de rata contienen dos acyl-CoA oxidasas, incluyendo palmitoil-CoA oxidasa (ACOX1) y pristanoil-CoA oxidasa (ACOX3), mientras que los peroxisomas de hígado contienen una oxidasa adicional, colestanoil-CoA oxidasa (ACOX2) (Van Veldhoven et al., 1992). Es interesante, destacar que los peroxisomas humanos solo tienen dos oxidasas, ACOX1 y ACOX2 con funciones y sustratos similares (Baumgart et al., 1996).

La enzima bifuncional enoil-CoA hidratasa/3-hidroxiil-acyl-CoA dehidrogenasa (LBP/DBP) cataliza la conversión de enoil-CoA a 3-ceto-acyl-CoA consumiendo una molécula de agua por molécula de enoil-CoA (Qin et al., 1997).

El último paso de la beta oxidación en mamíferos es realizado por tiolasas. La 3-oxoacil-CoA tiolasa A (ACAA1) y la SCP-2/3-oxoacil-CoA tiolasa (SCPx) son las dos tiolasas encargadas de realizar la catalisis a acetil-CoA. Tanto ACAA1 como SCPx tienen la misma especificidad de sustrato para 3-oxoacil-CoA (Antonenkov et al., 1999), mientras que SCPx es también específica a especies 3-oxoacil-CoA con un grupo ramificado 2-metil, como el ácido pristánico (Seedorf et al., 1994).

Defectos en el correcto funcionamiento de DBP o ACOX1 provocan acumulaciones anormales de VLCFA en tejidos y plasma, resultando en cuadros patológicos que encajan con el síndrome de Zellweger y Adrenoleucodistrofia respectivamente (van Grunsven et al., 1998; Wanders, 2004).

1.3.6 Malonil CoA descarboxilasa peroxisomal y acidúria malónica

La gran mayoría de ácidos grasos naturales contienen un número par de carbonos. Sin embargo, algunos ácidos grasos están formados a partir de un número impar de carbonos. La beta oxidación de VLCFA con número impar de carbonos, tiene como producto final de oxidación el propionil-CoA. La mayoría del propionil-CoA formado de la beta oxidación, es convertido al precursor del ciclo de los ácidos tricarboxílicos succinil-CoA, a través de la vía del metilmalonil-CoA (Scholem and Brown, 1983).

Sin embargo, hay otras vías metabólicas por las cuales propionil-CoA puede ser metabolizado (Fig.9). La ruta mayoritaria alternativa es la beta oxidación por la cual el propionil-CoA es convertido a acrilil-CoA, posteriormente a ácido 3-hidroxi propionico y después al semialdehido malónico.

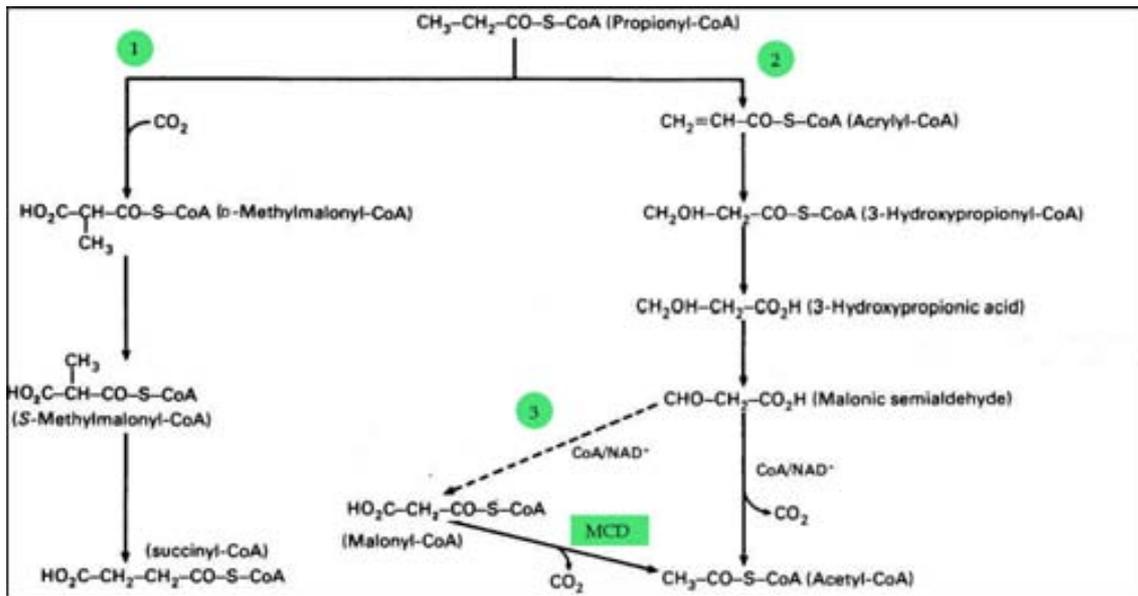


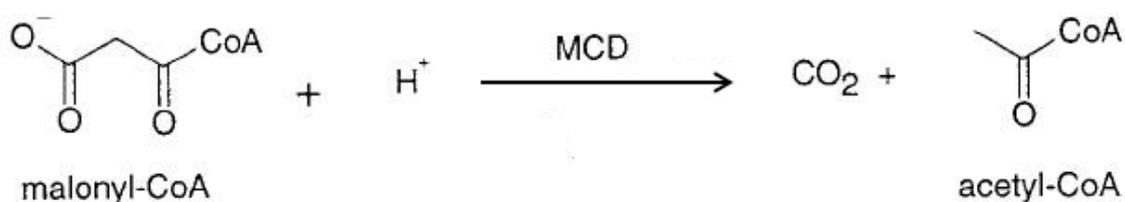
Fig.9 Metabolismo del Aldehído Malónico 1) Degradación del propionil-CoA mediante la ruta del metilmalonil-CoA, 2) Ruta del semialdehido malónico, 3) Variante descubierta en bacterias (Scholem and Brown, 1983)

Para los siguientes pasos, dos mecanismos se han propuesto: Conversión directa del semialdehido malónico a acetil-CoA (Yamada and Jakoby, 1960) y la conversión indirecta via malonil-CoA. Ésta última solo descrita hasta ahora en

bacterias (Vagelos, 1960). En mamíferos, se cree que la producción de malonil-CoA en peroxisomas resulta de la betaoxidación de ácidos grasos de número impar de carbonos, aunque no hay evidencias científicas experimentales que lo demuestren.

La importancia del metabolito malonil-CoA se puede observar a varios niveles de regulación. En peroxisoma, la acumulación del malonil-CoA se manifiesta con acidúria malónica, una enfermedad letal que se caracteriza por retraso mental, convulsiones, cardiomiopatía y acidosis (Footitt et al., 2010; Sacksteder et al., 1999) . En el citosol, puede inhibir la entrada de los ácidos grasos a la mitocondria o servir como precursor para la síntesis de ácidos grasos. Y finalmente, en la mitocondria es un intermediario entre los ácidos grasos y el acetyl-CoA que servirá de reserva para el ciclo de krebs (Saggerson, 2008).

La degradación de malonil-CoA en peroxisoma es catalizada por la Malonil-CoA descarboxilasa (MCD) (EC 4.1.1.9) mediante la reacción:



MCD se encuentra ampliamente distribuida desde bacterias a plantas y mamíferos (Hayaishi, 1955; Sacksteder et al., 1999). En humanos ha sido identificada en corazón, músculo esquelético, páncreas, hígado y riñones (Sacksteder et al., 1999), mientras que en rata, niveles apreciables de MCD mRNA se han detectado en hígado, corazón y tejido adiposo (Voilley et al., 1999).

La expresión del gen MCD comporta la transcripción de dos isoformas desde un único gen (Jang et al., 1989). Una isoforma más larga (54kDa) y distribuida en mitocondrias, y la otra más corta (49 kDa) encontrada en peroxisomas y citosol (Joly et al., 2005; Sacksteder et al., 1999). Consistente con la localización variable de MCD, la isoforma larga de la proteína contiene una secuencia de señalización hacia la mitocondria (aminoácidos 1-39) en el N-terminal. Mientras que la secuencia corta contiene únicamente la secuencia típica de señalización peroxisomal PTS1 en el C-terminal, también compartida por la isoforma larga.

Estudios iniciales en la caracterización de MCD de rata dieron unos valores de K_m y V_{max} de 54 μM y 18,8 $\mu mol/min/mg$ respectivamente, además de determinar el peso molecular por gel filtración del estado oligomérico: 160 kDa (Kim and Kolattukudy, 1978).

1.4 Malonil-CoA descarboxilasa citoplasmática y mitocondrial

1.4.1 Malonil-CoA Descarboxilasa en metabolismo energético

Parece ser que la función de MCD citoplasmática tiene un rol decisivo en la regulación de la utilización de glucosa o lípidos como combustible en tejidos humanos. El denominado ciclo Randle (Fig.10), que fue inicialmente propuesto en 1963, recoge las interrelaciones entre glucosa y ácidos grasos y como se regulan los flujos y la selección de los mismos entre tejidos de órganos en mamíferos (Hue and Taegtmeyer, 2009). Este tipo de ciclo no debe confundirse con un ciclo metabólico, tal como el ciclo de krebs. En un ciclo metabólico, una secuencia cíclica de cambios químicos produce un cambio químico general (Baldwin and Krebs, 1981). Mientras que el ciclo de Randle, describe las interacciones dinámicas entre los substratos del mismo.

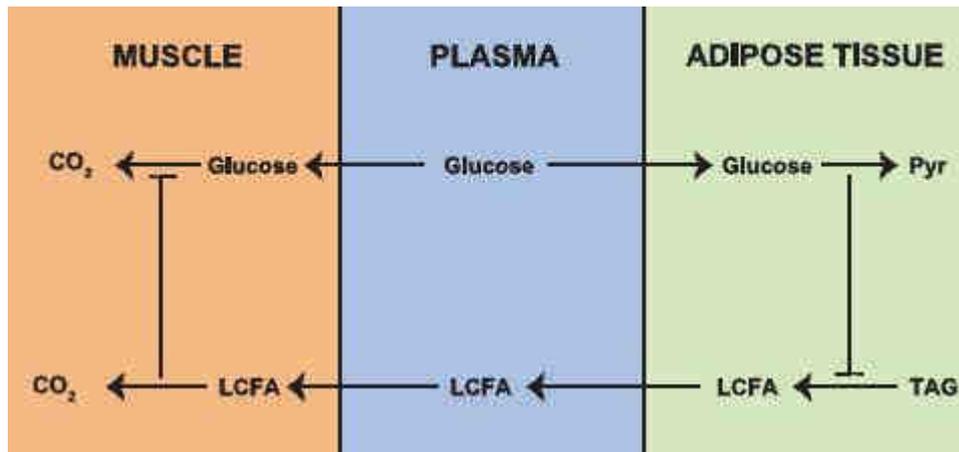


Fig.10 Ciclo Randle . El ciclo muestra la regulación existente entre glucosa y ácidos grasos de tejido lipogénico y tejido no lipogénico. (Hue and Taegtmeier, 2009)

Como podemos observar, la oxidación de la glucosa produce una inhibición de la oxidación de ácidos grasos e inversamente, la degradación de ácidos grasos inhibe la oxidación de glucosa (Fig.10) (ambos procesos se pueden producir tanto en tejido lipogénico como no lipogénico, sin embargo, la producción de ácidos grasos se realiza únicamente en tejido lipogénico a partir de acetil-CoA y malonil-CoA).

Hay varios ejemplos consistentes con el ciclo Randle, por ejemplo un estudio demuestra que el silenciamiento de la expresión del gen MCD por siRNA (75%) (del inglés *small interference ribonucleic acid*) incrementa al doble los niveles de malonil-CoA en miotubos. Además de este incremento, los niveles basales de oxidación de ácido palmítico en mitocondria se ven reducidos un 15%. La inhibición de la expresión de MCD mediante siRNA eleva los niveles de oxidación de glucosa 2.6 veces comparados con miotubos transfectados con secuencias diseñadas al azar (Bouzakri et al., 2008) (Fig.11).

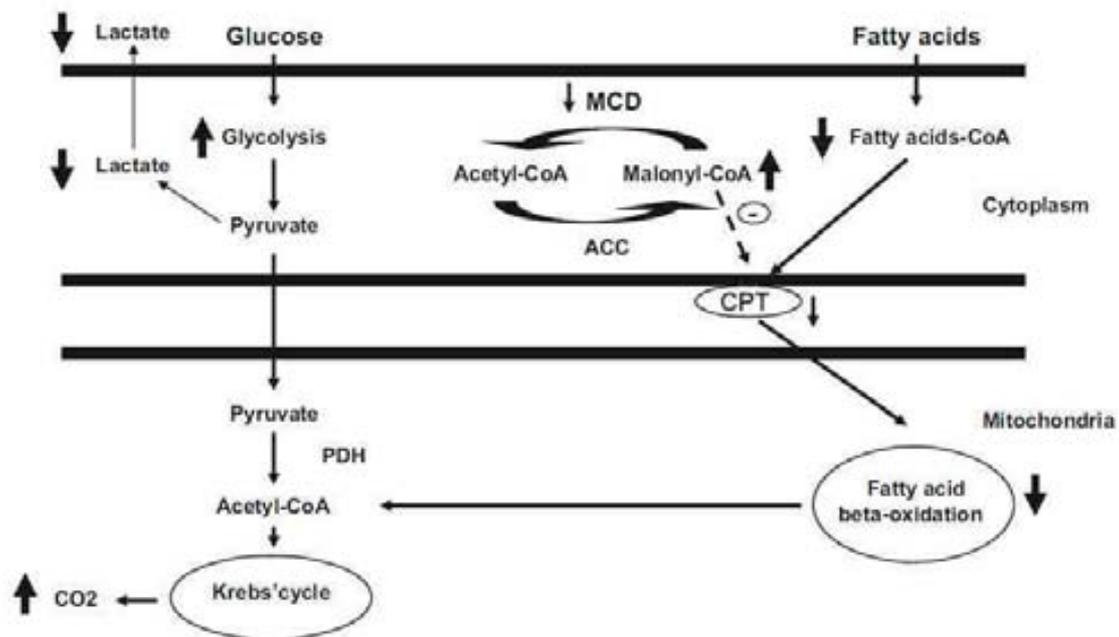


Fig.11 Efecto de la reducción de actividad de MCD en el citosol de miotubos humanos. La disminución de la actividad de MCD provoca un aumento de Malonil-CoA citoplasmático. A su vez, la inhibición de CPT por malonil-CoA aumenta y consecuentemente disminuye la importación de palmitato hacia la mitocondria. El resultado es una reducción en la beta oxidación mitocondrial y una disminución del producto final Acetil-CoA para entrar al ciclo de Krebs. Este hecho comporta un cambio de utilización de combustible biológico. La glucosa será utilizada para compensar el efecto producido por la disminución de actividad de MCD (Bouzakri et al., 2008).

Otro ejemplo en tejidos no lipogénicos como músculo esquelético o corazón, donde prácticamente no se utiliza el malonil-CoA para la síntesis de ácido palmítico, muestra que niveles elevados de malonil-CoA están relacionados con el aumento en la oxidación de glucosa mediante inhibición de CPT1 (del inglés *Carnitine palmytoil acyl transferase*) y reducción de la oxidación de LCFA en mitocondria (Rasmussen and Wolfe, 1999; Ruderman et al., 1999). De forma inversa, estudios recientes indican que un aumento en la actividad de músculo cardíaco humano produce un incremento del 55 % en la actividad de MCD acompañado de una disminución del 33% de malonil-CoA y consecuentemente, un 40% más de beta oxidación de LCFA (Goodwin and Taegtmeier, 1999).

En casi todos estos procesos de regulación del ciclo de Randle, el malonil-CoA está presente de alguna forma. Hay evidencias que sugieren la importancia del malonil-CoA como dispositivo intracelular para regular el

metabolismo energético y señalan que la concentración de malonil-CoA después de 48 horas en ayunas se reduce un 80% y se regenera a valores iniciales pasadas 24 horas después de una nueva ingesta (McGarry et al., 1983).

Es evidente que la concentración de malonil-CoA juega un papel decisivo en la regulación intracelular energética y que el nivel de producción o degradación del mismo delimita el uso de glucosa o lípidos como fuente de ATP para la célula. Para ello es de vital importancia tanto la función y correcta regulación de MCD, como el enzima acetil CoA carboxilasa (ACC).

ACC también interviene en la regulación de la concentración de malonil-CoA. La ACC sintetiza malonil-CoA a partir de acetil-CoA y su actividad puede inhibirse mediante AMPK por fosforilación (Ruderman and Prentki, 2004) o activarse alostéricamente por citrato (Saggerson, 2008) (Se cree que el citrato producido en el ciclo de krebs es un medidor del estado energético de la célula y un intermediario entre el ciclo de oxidación de glucosa y la betaoxidación de ácidos grasos ya que también tiene capacidad para inhibir los enzimas iniciales de la glicólisis). A su vez, AMPK es sensible a la activación por cambios en el aumento de la ratio AMP/ATP o insulina/glucagón (Saha and Ruderman, 2003). Algunos estudios indican que MCD es también activado por AMPK (Park et al., 2002; Saha and Ruderman, 2003), de forma que la disminución de la concentración de malonil-CoA se vería aún más acentuada con un mayor aumento en la beta oxidación de ácidos grasos en la mitocondria.

Estas respuestas rápidas dependientes de malonil-CoA en los cambios de suministro de energía en músculo se ha denominado mecanismo de detección y señalización de combustible (Ruderman et al., 1999).

1.4.2 Malonil-CoA y resistencia a insulina

La resistencia a insulina está caracterizada por anomalías en el metabolismo de lípidos y un consumo reducido de glucosa (Cline et al., 1999;

Dresner et al., 1999; Kelley et al., 2002a). La relación entre resistencia a insulina y acumulación de lípidos en tejidos, sugiere que los lípidos actúan como marcadores y mediadores de la disfunción metabólica, especialmente en músculo esquelético donde se da la mayor necesidad de glucosa estimulada por la acción de la insulina (Chibalin et al., 2008; Kelley et al., 1999).

Una hipótesis, discutida durante mucho tiempo, propone que la resistencia a insulina podría ser inducida debido a niveles disminuidos de beta oxidación de ácidos grasos en mitocondria de células musculares. El efecto directo es un aumento de ácidos grasos circulantes, provocando: 1) Un efecto agudo insulinoatrófico. 2) La capacidad de exacerbar la resistencia a insulina en músculo. 3) Su acción perjudicial a largo plazo en la función de las células betapancreáticas (Kelley et al., 2002b; McGarry, 1998). Los ácidos grasos acumulados en el citosol, son redireccionados hacia la síntesis del diacilglicerol, un ácido graso con potencial para inducir la inhibición de la vía de señalización de insulina (Debard et al., 2006; Harmancey et al., 2008; Morino et al., 2006). Estos bajos niveles de beta oxidación podrían estar a su vez, provocados por un aumento en la concentración de malonil-CoA, aunque se ha demostrado que el aumento de malonil-CoA como único causante de la resistencia a insulina no es suficiente (Ruderman et al., 1997).

Estudios recientes han cuestionado también esta hipótesis debido a los resultados obtenidos en diferentes investigaciones: 1) La inducción de la oxidación de ácidos grasos por el receptor activador de proliferación del peroxisoma (PPAR) no corrige la resistencia a insulina (Harmancey et al., 2008). 2) El aumento en la cantidad de lípidos manipulados genética o farmacológicamente, no induce resistencia a insulina (Cozzone et al., 2006). Estos resultados han dejado paso a una nueva hipótesis sosteniendo que el aumento en la beta oxidación de ácidos grasos es el desencadenante de la resistencia a insulina, en vez de la disminución de beta oxidación (Muoio and Newgard, 2006, 2008).

Sin embargo, esta última hipótesis, no es consistente con los resultados obtenidos por Jie An y colegas, en el cuál sostienen que la sobreexpresión de MCD y consecuente incremento de beta oxidación en hígado revierte la resistencia a insulina en músculo, hígado y otros tejidos (An et al., 2004).

Con todos estos resultados, se puede vaticinar que se necesitarán más estudios para elucidar las interacciones que rigen el ciclo Randle. Como hemos visto, hay muchas variables a incluir en el control entre la oxidación de la glucosa y oxidación de ácidos grasos mediados por malonil-CoA, substrato regulado directamente por ACC, MCD y AMPK, y indirectamente por la relación insulina/glucagón, AMP/ATP y citrato.

1.4.3 Malonil-CoA en Isquémia de corazón

El subministro energético del músculo de corazón se basa de un balance entre oxidación de ácidos grasos y glucólisis, suministrándole entre el 60-90% de la energía la oxidación de ácidos grasos (Saddik et al., 1993). En corazón, hay una importante interconexión entre las vías metabólicas de los substratos en cuestión. Cuando los niveles de ácidos grasos son elevados, el consumo de ácidos grasos se incrementa dominando respecto al de glucosa mediante su inhibición (Lopaschuk, 2004).

Por ello, es necesario regular de forma adecuada la oxidación de ácidos grasos en corazón. Una molécula muy importante en la regulación de la oxidación de ácidos grasos es malonil-CoA por su capacidad de inhibir la entrada de ácidos grasos en mitocondria. Los niveles de malonil-CoA en corazón son controlados por tres enzimas, ACC, MCD y AMPK. En isquémia, AMPK es rápidamente activada inhibiendo ACC y disminuyendo en consecuencia los niveles de malonil-CoA. El efecto final es el aumento de la oxidación de ácidos grasos y una disminución en la oxidación de glucosa. Además, AMPK debido a la demanda energética, puede activar la glicólisis anaeróbica causando un desacople en el balance entre oxidación de ácidos

grasos y glucólisis. Este desacople es el causante del exceso de protones y lactato disminuyendo así la eficiencia cardíaca y aumentando el daño por isquemia (Hopkins et al., 2003).

Se han propuesto algunos inhibidores de MCD como moléculas potenciales para posible terapia a los casos de isquemia de corazón (Dyck et al., 2004) y también los siRNA como futura terapia para determinados tipos de cáncer (Zhou et al., 2009).

1.4.4 Papel de Malonil-CoA descarboxilasa en mitocondria

Se cree que MCD mitocondrial está relacionada con la eliminación de malonil-CoA residual (Sacksteder et al., 1999), sin embargo, el acetil-CoA producido por MCD podría entrar en el ciclo de Krebs. En mitocondria de mamíferos, malonil-CoA puede formarse mediante la reciente descubierta ACSF3, una proteína mitocondrial con actividad malonil-CoA sintetasa partiendo de malonato (Witkowski et al.). Hay que destacar que en mitocondria no se ha encontrado ningún tipo de actividad Acetil-CoA Carboxilasa capaz de formar malonil-CoA. El malonil-CoA es el precursor para la síntesis de ácidos grasos en mitocondria. El proceso de síntesis de ácidos grasos mitocondriales fué descubierto recientemente y la función de los ácidos grasos resultantes de esa vía todavía no está caracterizada. Hasta la fecha, se sabe que algunos ácidos grasos, en especial el ácido octanoico, es el precursor del ácido lipóico, un ácido graso necesario para ser utilizado en modificaciones postraduccionales y que también tiene efecto directo sobre la actividad de RNA P, una proteasa endonucleotica con actividad 5' de los tRNA maduros de mitocondria (Chen and Martin, 1988; Hollingsworth and Martin, 1987). Además, la inactivación de algunos de los genes que codifican para alguna de las enzimas de la vía de la síntesis de ácidos grasos en mitocondria se observa una pérdida de funcionalidad en la alguno de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial (Hiltunen et al., 2009).

OBJETIVOS

2. Objetivos

Al iniciar este proyecto, no se disponía de ninguna estructura 3D de MCD para poder plantear un mecanismo de catálisis. Tampoco se podían estudiar las interacciones del sustrato en el centro activo del enzima. Lo que hubiese ayudado en gran parte para sugerir nuevos inhibidores con diferentes mecanismos de acción que los actuales para MCD.

Para abordar los problemas expuestos, se plantearon los siguientes objetivos:

1. Resolver la estructura tridimensional de MCD a alta resolución mediante técnicas de cristalografía de proteínas.
2. Resolver la estructura tridimensional de complejos de MCD con el sustrato o inhibidores.
3. Caracterizar MCD con ensayos de actividad.
4. Proponer un modelo para la catálisis enzimática de MCD y determinar las interacciones entre Pex5 y MCD.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. Materiales y métodos

3.1 Materiales

3.1.1 Lista de materiales y equipamiento utilizado en este trabajo:

- Espectrofotómetro Nanodrop® (Thermo scientific)
- Thermal mastercycler® 5331 (Eppendorf)
- Espectrofotómetro IR-UV Gene Genius (SynGene)
- Espectrofotómetro de placas Benchmark Plus (BioRad)
- Zeta sizer nano DLS (Malvern)
- Kit sistema 4 geles verticales de electroforesis Mini-protean tetra cell (BioRad)
- Kit sistema de transferencia electroforética Mini Trans-Blot (BioRad)
- Kit de purificación de DNA QIAprep® Spin Miniprep Kit (Quiagen)
- Marcador de DNA Perfect DNA 1kbp Ladder (Novagen)
- Teñidor de DNA SYBR® safe (Invitrogen)
- Primers para amplificaciones de PCR sintetizados en (Roche)
- Teñidor fluorescente de Proteínas SYPRO® Orange (Invitrogen)
- Marcador de Proteínas pre-teñido SeeBlue® Plus2 (Invitrogen)
- Microscopio Nikon SMZ 800/1000
- Centrífuga Avanti J-25, Avanti J-20 XP (Beckman Coulter)
- Centrífugas de mesa 5415R (Eppendorf)
- Centrífuga de mesa MiniSpin Plus (Eppendorf)
- Cartesian honeybee (Hamilton)
- Crystal Phoenix robot (ARInstruments)
- Jeringas Hamilton TLC (Hamilton)
- Kit purificación de DNA GFX™ (GE Healthcare)
- Filtros Millipore preparación muestras para cromatografía 0.22 µm/0.45 µm (Millipore)
- Membranas de PVDF Inmobilon (Millipore)
- Membranas durapore 0.22 µm (Millipore)
- MBP trap HP 1 y 5 ml (GE Healthcare)

- His trap HP 1 y 5 ml (GE Healthcare)
- Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare)
- Superdex 200 16/60 GL (GE Healthcare)
- Mono S Resource 10/100 (GE Healthcare)
- Diálisis (sacos)
- LR clonase Gateway system (Invitrogen)
- BP clonase Gateway system (Invitrogen)
- Vector de clonaje pET-DEST-42-N112 (Hamburgo, EMBL)
- AKTA Basic (Amersham Biosciences)
- AKTA Purifier 10 (Amersham Biosciences)
- AKTA Purifier 100 (Amersham Biosciences)
- AKTA Explorer (Amersham Biosciences)
- Tabletas para Buffer PBS (Sigma-Aldrich)
- Bis-Tris Propane en polvo (Sigma-Aldrich)
- Kits de cribado para cristalografía de proteínas Crystal screenings (Hampton Research)
- Tabletas de Inhibidores de proteasa Complete EDTA-Free (Roche)
- SeMet (Sigma-Aldrich)
- Medio libre de seleniometionina MD12-500GF (Molecular Dimensions)
- Vivaspin 500 (GE Healthcare)
- Vivaspin 2 (GE Healthcare)

3.1.2 Páginas web utilizadas y servidores

- www.rcsb.org (Protein Data Bank)
- www.uniprot.org (Universal Protein Resource)
- www.ebi.ac.uk (European Bioinformatics Institute)
- www.peroxisomedb.org (Peroxisome Database)
- www.cybergene.se (Oligos Design)
- <http://mgc.nci.nih.gov/> (Mammalian Gene Collection)
- www.expasy.ch (SIB Bioinformatics Resource Portal)
- www.ncbi.nlm.nih.gov (National Center for Biotechnology Information)

- www.ddbj.nig.ac.jp (Japanese genomic database)
- www.protocol-online.org/ (Protocol website)
- www.embl-hamburg.de/Auto-Rickshaw/ (Automatic crystal structure determinatio platform)
- http://ekhidna.biocenter.helsinki.fi/dali_server/ (Comparing protein structures in 3D)
- <http://haddock.chem.uu.nl/> (Biomolecular interaction webportal)
- www.ensembl.org (Genome database of vertebrate and other eukaryotic species)
- <http://genome.ucsc.edu/> (Genome browser website)
- <http://www.brenda-enzymes.org>

3.2 Metodología

3.2.1 Clonaje de MCD

Después de fracasar en el intento de amplificar el cDNA mediante las dos PCR del sistema Gateway (Fig.12), el cDNA de Malonil-CoA descarboxilasa Humana con número MGC3193 (del inglés Mammalian gene collection) fue amplificado mediante la reacción de la polimerasa (PCR) usando los oligonucleótidos 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGAAAA CCTGTATTTTCAGGGCAGCGGCGGATGGACGAGCTGCTGCGCCGC-3' (Forward) y 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGTTATCAGAG CTTGCTGTTCTTTTG-3' (Reverse) en una reacción única de PCR que añade la secuencia de recombinación, el lugar de corte por proteasa TEV (del inglés Tobacco Etch Virus) y el espaciador entre el lugar de corte y el inicio de la proteína. La temperatura utilizada para la hibridación fue 54°C.

El fragmento amplificado y purificado con el kit GFX™ Band purification (GE Healthcare) fue insertado en el vector de expresión pET-DEST-42-N112 (obtenido del Dr. Fran Fernández, EMBL) mediante recombinación con el sistema Gateway® (Invitrogen). El producto de recombinación fue secuenciado para comprobar que la pauta de lectura no se había modificado.

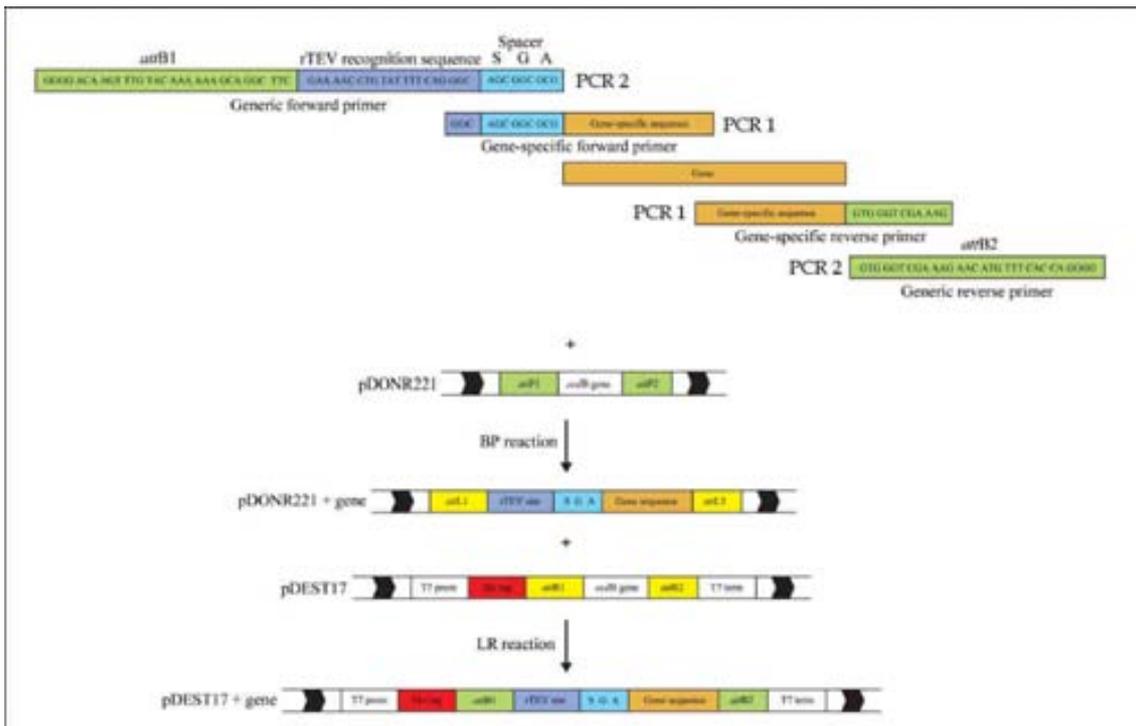


Fig.12 Esquema de clonaje mediante el sistema Gateway. Después de realizar dos PCR sobre el fragmento a clonar, se utilizan dos pasos de recombinación para insertar el gen dentro del vector. La reacción BP y la reacción LR. En verde AttB1, AttB2, AttP1 y AttP2, aparecen las zonas de recombinación de los fragmentos amplificados a clonar y del vector donador respectivamente. Las zonas amarillas AttL1 y AttL2 representan las zonas de recombinación generadas después de la reacción BP. Las zonas amarillas AttR1 y AttR2 son las regiones de recombinación del vector de expresión.

3.2.2 Mutagénesis de los residuos E302A, C206S, C243S y C206S/C243S

Los mutantes se realizaron en la plataforma de proteínas dirigida por el Dr. Nicholas Berrow (IRBBarcelona). Las PCR de los mutantes se realizaron con los oligonucleótidos : **E302A** 5'-AGCAGGGACTCCAAGGGGTG**GGC**CTGGGA ACATTCCTCATAAAGC-3' (Forward) 5'- ATGGTCTAGAAAGCTTTAGAGCT TGCTGTTCTTTTGAAACTGGGC-3' (Reverse), **C206S** 5'- CGGGTTACCTGGC ATTCACCGAGCGAAGTGCTTCAGAAAATCAGTGAGGC-3' (Forward) 5'- G CCTCACTGATTTTCTGAAGCACTTC**GCT**CGGTGAATGCCAGGTAACCCG-3' (Reverse), **C243S** 5'- TACAGAAGGTGTTACTTCTTTTCTCACAGCTCGACC CCTGGGGAGCCCCT (Forward) 5'- AGGGGCTCCCCAGGGGT**CGAGCT**GTG

AGAAAAGAAGTAACACCTTCTGTA-3' (Reverse), **C206S/C243S** 5'-AAGTTCTGTTTCAGGGCCCGATGGACGAGCTGCTGCGCCG-3' (Forward) (Producto de reacción de mutante C206S) 5'-AGGGGCTCCCCAGGGGTCGAG **CTGTGAGAAAAGAAGTAACACCTTCTGTA-3'** (Reverse) (En rojo aparecen las mutaciones). Los fragmentos obtenidos se clonaron en pOPINM previamente digerido con KpnI i HindIII mediante el sistema InFusion® (Clontech).

3.2.3 Expresión de MCD silvestre y mutantes

Los pruebas iniciales de expresión y solubilidad de MCD se realizaron a 37°C, 20°C y 17°C en células E.Coli BL21(DE3) recogiendo muestras a tiempo inicial, 1h, 3h y O/N (del inglés overnight) después de inducir con 0.3mM IPTG a OD₆₀₀ = 0.7.

Para la obtención de MCD silvestre y sus variantes mutadas, se crecieron cultivos de células E.Coli BL21(DE3) previamente transformadas con los plásmido pET-DEST-42-N112-MCD, pOPINM-MCD-C206S, pOPINM-MCD-C243S y pOPINM-MCD-C206S/C243S cada uno en 2 L de Superior Broth (AthenaES) O/N a 17 °C y 0.3mM IPTG.

3.2.4 Preparación de MCD con medios de Seleniometionina

La proteína recombinante MCD marcada con SeMet (Seleniometionina) fue expresada en 1L de medio libre de metionina MD12-500-GF (Molecular dimensions) enriquecido con 20mL OnEx solution 1 (Molecular dimensions), 50mL OnEx solution 2 (Molecular dimensions), 1 mL OnEx solution 3 (Molecular dimensions), 50 mL de SeMet glucose free nutrient mix (Molecular dimensions), 90 mg L-Seleniometionina (Sigma-Aldrich), 100 mg de Lisina, Treonina, Fenilalanina (Sigma-Aldrich), 50 mg de Leucina, Isoleucina, Valina (Sigma-Aldrich), 100mg Ampicilina e inoculado con células E.Coli BL21(DE3), transformadas previamente con el plásmido pET-DEST-42-N112-MCD. La expresión de la proteína se inició por autoinducción (Studier, 2005) después de

crecer los cultivos durante 6h a 37°C y cambiar la temperatura a 25°C durante 20h.

3.2.5 Purificación de MCD silvestre y sus variantes

El cultivo celular obtenido de MCD silvestre fue centrifugado a 10000g y el precipitado se resuspendió en tampón de lisis 1xPBS (del inglés phosphate buffered Saline) (Sigma-Aldrich), 10 mM DTT, 0.5 mM EDTA y una mezcla de inhibidores de proteasa (Complete free-EDTA,Roche). Se lisaron las células mediante sonicador y el extracto celular fue centrifugado 30 min a 48000g, 4°C. El sobrenadante se cargó en una columna MBP-trap 1mL previamente equilibrada con tampón 1xPBS, 10 mM DTT y se lavó la columna hasta que no se apreciaron muestras de proteína a 280nm. La elución se llevo a cargo con un paso al 100% de tampón 1xPBS, 10mM DTT, 10 mM Maltosa. Las fracciones de 0,5mL recogidas de MCD-MBP se unieron y se realizó una prueba de digestión con diferentes relaciones de proteína:proteasa TEV (del inglés, Tobacco Etch Virus) a diferentes tiempos y temperaturas. Finalmente, la digestión se realizó a una relación 1:50 MCD y TEV respectivamente O/N (del inglés overnight) y 20°C. El resultado de la digestión se paso por una columna de exclusión molecular SD200 10/300 GL (GE Healthcare) equilibrada en 1xPBS, 10 mM DTT. Las fracciones obtenidas de la gel filtración se concentraron en un volumen de 500µL, se cargaron en una columna de intercambio iónico MonoS equilibrada en 50 mM Bis-tris, 2 mM DTT, 20mM NaCl (Cloruro Sódico) y se eluyeron con un gradiente lineal de 20mM NaCl a 1M NaCl.

Tanto las variantes mutadas como la preparación de MCD con medios de SeMet fueron purificados mediante el mismo protocolo que MCD, excepto que en la digestión O/N para las mutantes se utilizó Prescision como proteasa para el corte (GeHealthcare)

3.2.6 Identificación y caracterización de la estabilidad de MCD en solución

Para el análisis en solución de MCD se utilizaron las técnicas DLS (del inglés Dynamic Light Scattering), DSF (Differential scanning Fluorimetry) y los geles de exclusión molecular.

La técnica DLS utiliza la dispersión de la luz para analizar el contenido de las muestras en solución según su tamaño. De este modo se puede comprobar si una solución está compuesta de una sola especie (baja polidispersidad) o de una mezcla de especies (alta polidispersidad). Además es una técnica no invasiva, así que se puede reaprovechar la muestra. Los ensayos de DLS se realizaron con un volumen de muestra de 60 μL a concentración de 0.5 mg/mL de MCD silvestres en diferentes tampones, variando el pH (6.0-9.0) y la cantidad de NaCl.

Mediante DSF se puede comprobar el grado de plegamiento de las proteínas y la estabilidad que le confieren los cambios producidos por la adición de compuestos de bajo peso molecular. Hay varios parámetros que pueden afectar a la estabilidad de una proteína como la temperatura, composición del tampón y pH, sales, detergentes, y ligandos que pueden unir a la proteína de forma específica o inespecíficamente, variando su energía de Gibbs. Este diferencial de energía de Gibbs puede ser aprovechado para ver cambios de estabilidad en la muestra debido a un cambio en la temperatura de fusión T_m (del inglés Melting Temperature). Para ello, la técnica DSF utiliza una sonda fluorescente que se une a las zonas hidrofóbicas de la proteína. A medida que se aumenta la temperatura, la proteína pierde estabilidad y se desnaturaliza. La desnaturalización es seguida a través de fluorescencia mostrada como función de temperatura, mostrando así una curva sigmoidea a medida que la proteína se despliega. El punto de inflexión de la función sigmoidea corresponde a la T_m (Niesen et al., 2007). Las pruebas de DSF se realizaron en placas de 96 pozos conteniendo cada uno de ellos la siguiente mezcla por triplicado: 5 μL de MCD a 5mg/ml en 50mM Tris pH 7.5, 150 mM

NaCl + 7.5 μ L SYPRO orange (preparado en el mismo tampón que la proteína) + 12.5 μ L 2x del compuesto a ser probado (tabla.1). Los cribados de reactivos se realizaron con diferentes tampones, en el rango de pHs (3,5-8,0) con 150mM NaCl y sin NaCl. El tampón de la proteína fue utilizado como pozo control negativo. La temperatura utilizada en el barrido de desnaturalización se incrementó 1°C/min desde los 25 °C hasta 85 °C.

Tabla.2 Condiciones y aditivos de los pozos para análisis mediante DSF

Pozillo	Condición
A1	50 mM Ácido cítrico pH 3.5
A2	50 mM Citrato sódico pH 4.5
A3	50 mM Bis tris pH6.5
A4	50mM Tris pH 7
A5	50 mM HEPES pH 7
A6	50 mM BisTris pH 7
A7	50mM Tris pH 7.5
A8	50 mM BisTris pH 7.5
A9	50 mM HEPES pH 7.5
A10	50 mM BisTris pH 8
A11	50 mM HEPES pH 8
A12	50mM Tris pH 8
B1	50 mM Ácido cítrico pH 3.5 + 50 mM NaCl
B2	50 mM Citrato sódico pH 4.5 + 50 mM NaCl
B3	50 mM Bis tris pH6.5 + 50 mM NaCl
B4	50mM Tris pH 7+ 50 mM NaCl
B5	50 mM HEPES pH 7 + 50 mM NaCl
B6	50 mM BisTris pH 7 + 50 mM NaCl
B7	50mM Tris pH 7.5 + 50 mM NaCl
B8	50 mM BisTris pH 7.5 + 50 mM NaCl
B9	50 mM HEPES pH 7.5 + 50 mM NaCl
B10	50 mM BisTris pH 8 + 50 mM NaCl
B11	50 mM HEPES pH 8 + 50 mM NaCl
B12	50mM Tris pH 8 + 50 mM NaCl
C1	1 mM DTT
C2	5 mM DTT
C3	10 mM DTT
C4	1 mM Malonil-CoA
C5	2,5 mM Malonil-CoA
C6	10 % Glicerol
C7	5% Glicerol
C8	5 mM Maltosa
C9	10 mM L-Cisteine
C10	20 mM L-Cisteine
C11	(Blanco) 50mM Tris pH7 + 150 mM NaCl

3.2.7 Cristalización de MCD silvestre y marcada con SeMet

Los cribados iniciales de cristalización de MCD silvestre se hicieron en placas MRC-2 Greiner a 20°C y 4°C con concentraciones entre 6-10 mg/mL. Las gotas contenían 100nL de la proteína en tampón 50mM Bis-Tris pH 6.5, 150mM NaCl + 100nL de la condición de cristalización de los kits comerciales de Hampton. Se probaron relaciones de gota 1:1, 1:2 y 2:1 proteína:condición respectivamente con la técnica de difusión de vapor en gota colgante. Los primeros cristales (tipo I) (Fig.19) aparecieron en 1 semana y siguieron creciendo durante los 4 días siguientes. El escalado a placas Linbro de 24 pozos se hizo con 1µL de la solución de proteína + 1µL de la condición de cristalización a 20°C.

Para los ensayos iniciales de cristalización de MCD SeMet, se mezclaron 100 nL de proteína a 6 mg/mL en tampón 50mM BisTris pH 6.5, 150mM NaCl con 100 nL de cada una de las condiciones de los kits comerciales de cristalización de Hampton en placas MRC-2 Greiner de 96 pozos a 20°C. Al igual que con MCD silvestre, se utilizó la técnica de difusión de vapor. En 4 días aparecieron los primeros cristales de tipo II (Fig.20) en la condición D9 de la PAC2. Para optimizar los cristales de MCD SeMet se escaló en placas de 24 pozos mezclando 1µL de MCD y 1µL de la condición variando los precipitantes.

Con el objetivo de seguir optimizando los cristales tipo II, se hicieron pruebas a diferentes relaciones de gota proteína:condición de 1:2, 1:4, 1:6 y 1:8 respectivamente obteniendo un tercer tipo de cristal (tipo III) (Fig.21).

Malonil-CoA fue utilizado en la co-cristalización para intentar mejorar los tres tipos de cristales. También se probaron inhibidores de MCD en fase de experimentación por la empresa Chugai Pharmaceutical Europe LTD con el fin de optimizar los cristales.

3.2.8 Recogida de datos, procesado y refinado de la estructura de MCD

Los tres tipos de cristales fueron congelados en nitrógeno líquido con 20% glicerol como agente crioprotector.

Los cristales tipo I sirvieron para hacer experimentos iniciales de difracción de rayos-x en la línea microfoco ID23-2 del ESRF de Grenoble, Francia .

Se realizaron experimentos de difracción de los cristales tipo II en la línea ID29 del sincrotrón ESRF. Se recogieron datos a 100K (Kelvin) hasta 3.29Å perteneciendo al grupo espacial triclinico. La longitud de onda utilizada para experimentos de SAD (del inglés Single Anomalous Dispersion) fue la óptima para el pico de absorción del Selenio, 0.9786Å, determinada experimentalmente con un espectro de fluorescencia. Los datos fueron procesados mediante XDS (Kabsch, 2010) y TRUNCATE (French and Wilson, 1978). La búsqueda inicial de los átomos de seleniometionina se realizó con el programa SHELX (Sheldrick, 2010).

Se recogió un segundo conjunto de datos hasta 4.2Å de los cristales tipo III perteneciendo al grupo espacial hexagonal P₆₁22. La línea utilizada fue Proxima1 del sincrotrón Soleil de Paris, Francia. La longitud de onda de la recogida fue 0.9791Å y la temperatura aproximada de 100K. Se procesaron los datos con XDS (Kabsch, 2010) y TRUNCATE (French and Wilson, 1978) y se realizó la búsqueda de las posiciones de los átomos de seleniometionina con el programa SHELX. Se utilizó RESOLVE (Terwilliger and Berendzen, 1999) para buscar simetría no cristalográfica y aplicarlo en la construcción de la estructura y mapa preliminar con un tetrámero en la unidad asimétrica. Se utilizó el mapa de densidad preliminar para crear una máscara y un mapa recortado cubriendo la unidad asimétrica del cristal con grupo espacial P₆₁22. Se utilizó el mapa generado de la unidad asimétrica para realizar reemplazo molecular con Phaser (McCoy, 2007) en el grupo espacial triclinico P1. Posteriormente se realizó

promediado de cristales entre P6122 y P1, extendiendo las fases de 4.2Å a 3.29Å utilizando DM y las matrices de rotación y traslación de P6₁22 a P1 obtenidas del reemplazo molecular. El mapa a 3.29Å proporcionó una estructura inicial que fue refinada manualmente con ciclos de Coot (Emsley and Cowtan, 2004) y REFMAC (Murshudov et al., 1997) utilizando TLS y restricciones de los factores de temperatura para aprovechar la simetría no cristalográfica. Finalmente se realizó un último ciclo de refinado con BUSTER (Blanc et al., 2004)

3.2.9 Validación de MCD

Para la validación de la estructura atómica de MCD se realizaron diferentes análisis con programas informáticos que comprueban la calidad de los datos respecto al modelo construido, la estereoquímica de los átomos y la geometría de los enlaces. Para el análisis de la calidad del modelo atómico construido respecto a los factores de estructura se utilizó el programa SFCHECK (Vaguin et al., 1999). También se comprobó la distribución estereoquímica de la estructura proteica mediante el programa de validación PROCHECK (Laskowski et al., 1993). Finalmente, la geometría de los enlaces entre átomos (distancia, ángulo, torsión) se examinaron con mapas de Ramachandran. Además de estos exhaustivos análisis informáticos de validación de estructura se comprobó que el valor de R_{free} fuese menor del 25 % o aproximado y que la diferencia entre $R_{\text{free}}-R_{\text{crist}}$ sea menor de 5 %. También se constató que los factores de temperatura tuviesen valores razonables.

El modelo final de MCD se depositó en la base de datos del Protein data Bank. El código asignado para MCD fue 4F0X.

3.2.10 Análisis en gel SDS no reductor de MCD y sus variantes pre-tratadas con H₂O₂

Para los análisis en gel SDS no reductor se realizaron incubaciones de MCD silvestre, los mutante C206S, C243S y C206S/C243S con 100mM H₂O₂ durante 3h a 4°C. La cantidad de proteína cargada en cada muestra fue aproximadamente de 15µg en tampón 1x PBS. El gel SDS 12% Acrilamida se

cargó sin β -Mercaptoetanol en el tampón de carga de las muestras con la intención de no reducir los grupos tiol y que se pudiesen observar los puentes formados por la acción del H_2O_2 (Fig.32A).

En un segundo gel, también se realizaron incubaciones de MCD con un amplio rango de concentraciones de H_2O_2 que va desde 50mM a 1.6M para analizar el comportamiento de los enlaces disulfuro entre las subunidades del tetrámero biológico. El protocolo seguido fue idéntico al utilizado en el gel con MCD y mutantes (Fig.32B).

3.2.11 Ensayos de actividad de MCD silvestre y mutantes

La actividad de MCD silvestre y mutantes fue analizada espectroscópicamente midiendo la cantidad de NADH formado en la reacción acoplada con la Malato Deshidrogenasa y Citrato Sintasa (Kolattukudy et al., 1981). La mezcla de reacción contenía 20 mM Tris pH 8.5, 4mM malato, 4 mM NAD^+ , cantidades varias de malonil-CoA (0.05-4mM), 8.9 unidades de Malato Deshidrogenasa, 3.1 unidades de Citrato Sintasa y 120ng de MCD en un volumen total de 100 μ L. La reacción se inició por la adición de MCD, y se midió el incremento de absorbancia a 340nm . Las constantes cinéticas fueron determinadas por ajuste de los datos en la ecuación de Hill (Ec.1) mediante regresión no lineal de mínimos cuadrados utilizando el programa Origin 5.0. En la Ec.1 la constante n es el coeficiente de Hill y la variable $S_{0.5}$ es la concentración de sustrato necesaria para llegar al 50% de la velocidad máxima.

$$v = \frac{V_{\max} [S]^n}{[S_{0.5}]^n + [S]^n} \quad \text{Ec.1}$$

La caracterización de las muestras de MCD silvestre y mutadas oxidadas fue realizada mediante el mismo protocolo, aunque fueron oxidadas previo análisis cinético incubándolas con concentraciones diferentes de H_2O_2 (50-

200mM) 3h a 4°C seguido de una purificación en gel filtración para eliminar el exceso de H₂O₂

3.2.12 Ensayos de interacción de MCD con Pex5

Los ensayos de interacción del dominio C-Terminal de MCD con el receptor Pex5 fueron realizados con el software HADDOCK (del inglés High Ambiguity Data-Driven biomolecular Docking) (de Vries et al.) utilizando las coordenadas de los códigos PDB 4F0X y de 1FCH, respectivamente.

Para el análisis de interacción, se realizó la superposición de la secuencias de transporte PTS1 (Ser491-Lys492-Leu493) encontrada en una de las subunidades de MCD con el péptido encontrado en el complejo formado por Pex5 y PTS1 (1FCH). Se fijó el residuo Ser491 y se lanzó el programa HADDOCK utilizando desde la Met40 hasta la Asn490 de MCD.

RESULTADOS

4. Resultados

4.1 Obtención de Malonil-CoA Descarboxilasa

4.1.1 Clonación, Expresión y purificación de MCD silvestre y mutantes

Inicialmente se probó el sistema de clonaje Gateway en un vector con proteína de fusión MBP pET-DEST-42-N112 (del inglés, Maltose Binding Protein) ya que trabajos anteriores habían constatado que le concedía solubilidad y estabilidad a la proteína (Zhou et al., 2004). Sin embargo, la amplificación de cDNA de MCD silvestre mediante dos pasos de PCR no funcionó. La primera PCR produjo un fragmento correspondiente a los 1500kb de DNA de MCD pero la segunda PCR no amplificó nada. Por consiguiente, se planeó utilizar un oligonucleótido único incluyendo los dos pasos descritos en el protocolo de clonación por Gateway. En este caso, se solucionó el problema de la amplificación del cDNA y la clonación no tuvo ningún contratiempo más. La expresión en pequeña escala de MCD a 37°C y 20°C produjo un 95 % de proteína en las fracciones insolubles. No obstante, la expresión a 17°C resultó en la producción aproximada de un 50% en la fracción soluble (Fig.13).

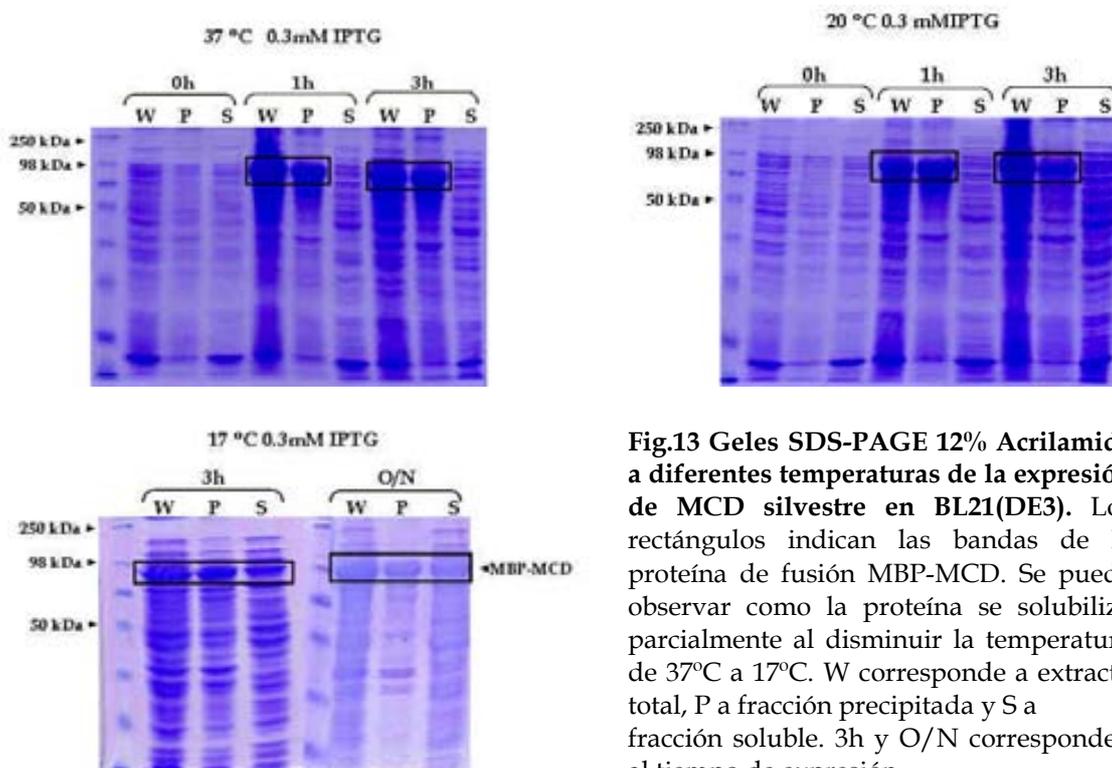
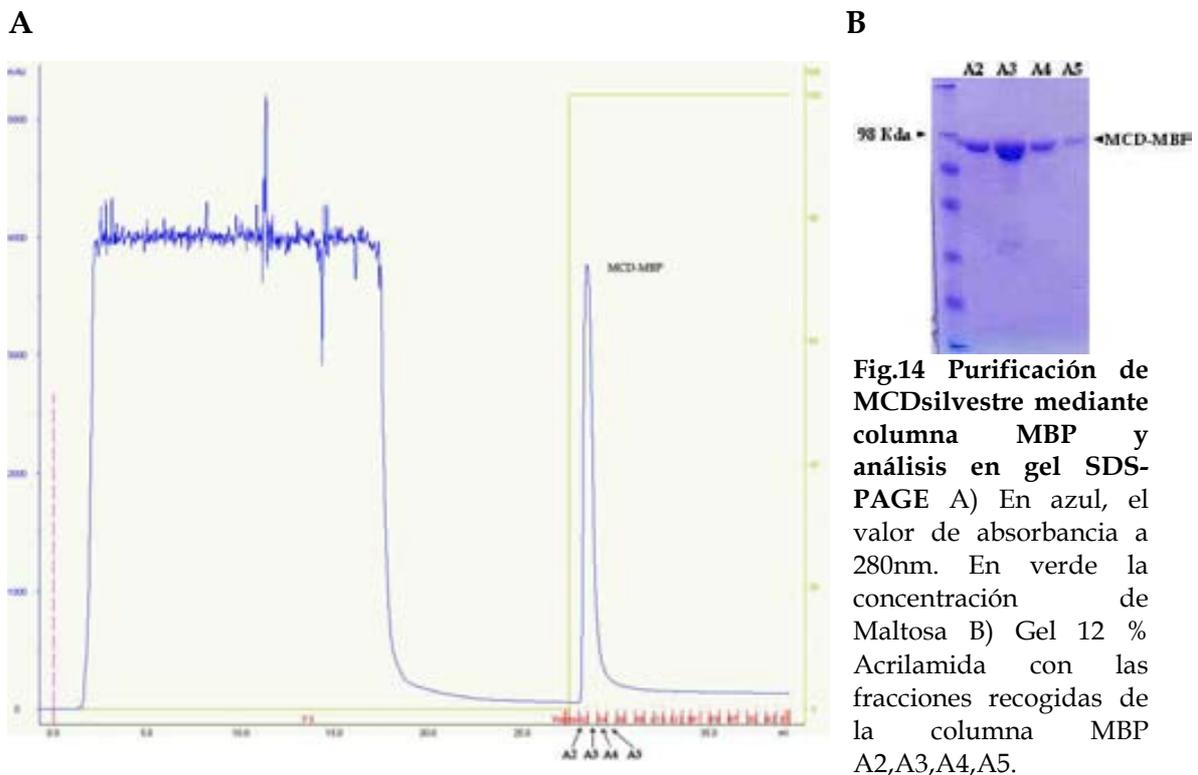


Fig.13 Geles SDS-PAGE 12% Acrilamida a diferentes temperaturas de la expresión de MCD silvestre en BL21(DE3). Los rectángulos indican las bandas de la proteína de fusión MBP-MCD. Se puede observar como la proteína se solubiliza parcialmente al disminuir la temperatura de 37°C a 17°C. W corresponde a extracto total, P a fracción precipitada y S a fracción soluble. 3h y O/N corresponden al tiempo de expresión

El peso teórico de MCD calculado con ProtParam (Bairoch et al., 2005) es 50.9 kDa que sumado a los 43 kDa teóricos de MBP da una proteína de fusión de 93.9 kDa. Como se puede apreciar en la figura 13, la proteína de fusión unida a MCD migra como una proteína de 95kDa aproximándose mucho al peso teórico.

Con las condiciones ideales de expresión (17°C, O/N y 0.3mM IPTG), se procedió a la expresión y purificación en gran escala con cultivos de 2L. El extracto celular obtenido de la lisis, se cargó en una columna MBP y se recogieron las fracciones de 0,5 mL del paso de elución al 100% de maltosa (Fig.14A). La proteína resultante contenía un alto grado de pureza según gel SDS, aunque se observan algunas bandas de degradación de MBP confirmado por PMF (del inglés Peptide Mass Fingerprinting) (Fig.14B).



Las fracciones A2,A3,A4,A5 se mezclaron y se hicieron pruebas a pequeña escala de la digestión. Se digirió con proteasa TEV a diferentes relaciones proteína:proteasa a 20°C y 4°C de temperatura cogiendo muestras a 1h, 3h y

O/N. La digestión O/N 1:50 a 20°C mostró un rendimiento superior a la O/N 1:50 a 4°C. Los demás tiempos no fueron suficientes para cortar la totalidad de la proteína en ninguno de los casos, resultando en un rendimiento muy bajo (Fig.15).

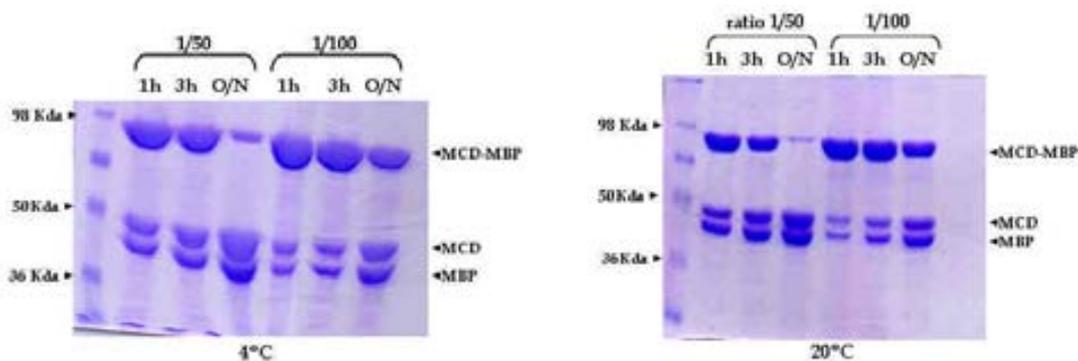


Fig.15 Geles SDS-PAGE 12 % Acrilamida de la digestión de MCD-MBP silvestre con proteasa TEV. La digestión se realizó a 20°C y 4°C. Los carriles 1h, 3h y O/N indican el tiempo de la digestión. La relación de proteasa esta indicada con 1/50 y 1/100 y los fragmentos de la digestión MCD y MBP están marcados con un triángulo negro a la derecha.

Con las condiciones óptimas de digestión (20°C O/N 1:50) se procesó toda la muestra. El resultado de la digestión de las fracciones A2,A3,A4,A5 a 20°C O/N se concentró hasta 500µL y se cargó en una gel filtración para proceder a su separación de la proteína de fusión MBP y se analizaron las fracciones de la cromatografía (Fig.16).

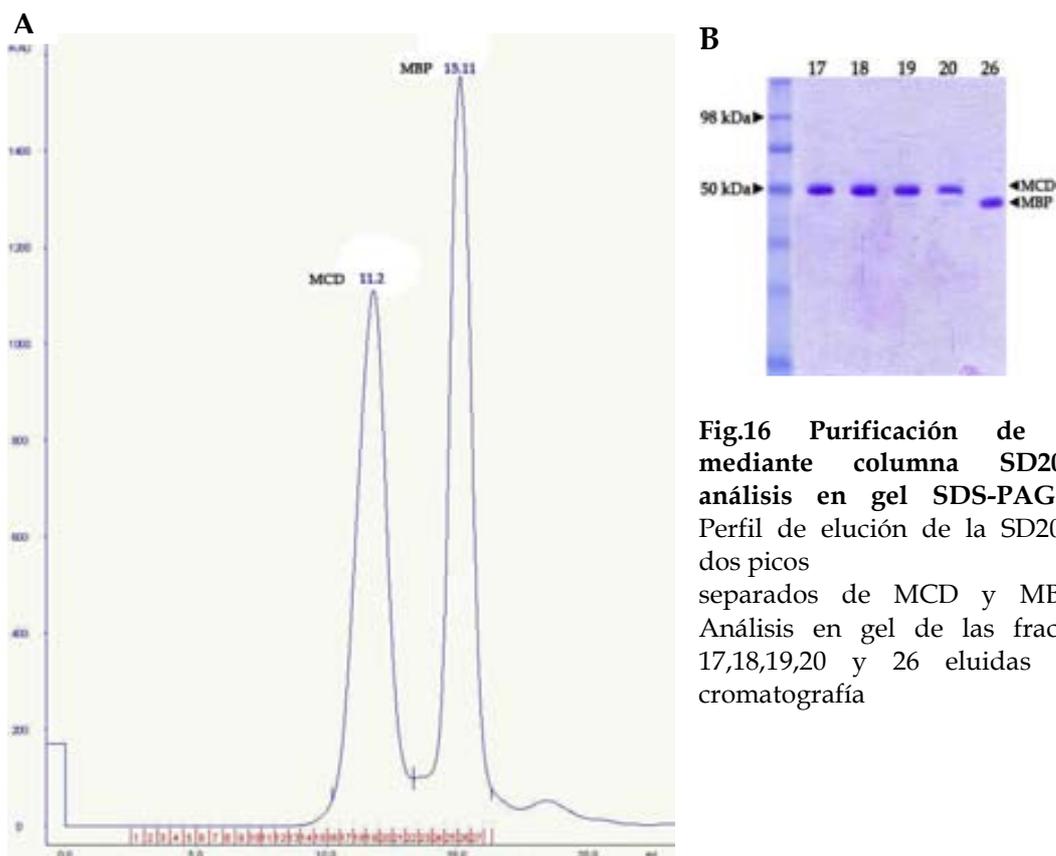
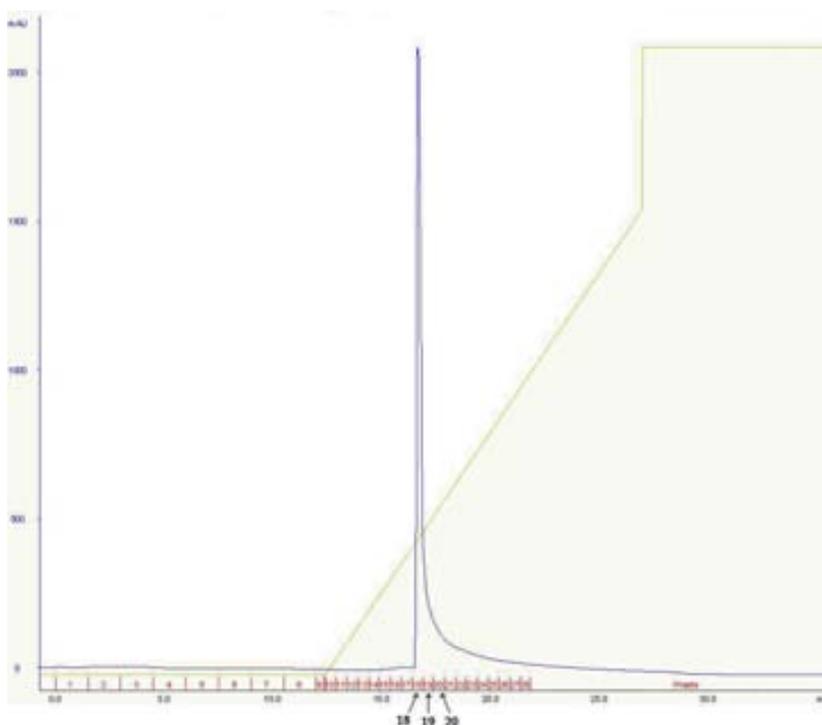


Fig.16 Purificación de MCD mediante columna SD200 y análisis en gel SDS-PAGE. A) Perfil de elución de la SD200 con dos picos separados de MCD y MBP. B) Análisis en gel de las fracciones 17,18,19,20 y 26 eluidas en la cromatografía

La cromatografía muestra un volumen de elución de MCD de 11.2 mL y de 15.11 mL para MBP. Aunque los resultados de purificación de MCD mediante columna MBP y gel filtración SD200 resultaron en una muestra de al menos 95% pura según análisis en gel SDS-PAGE (Fig.16B), las fracciones de MCD 18,19 y 20 de la gel filtración contienen alguna pequeña banda de contaminación. Por ello se recurrió a un paso final de purificación con columna de intercambio iónico monoS. El paso de purificación final reportó una mejora en la pureza de la muestra como se observa en el gel SDS de la figura 17. Las fracciones 18,19 y 20 de la MonoS se concentraron a 6mg/mL y se utilizaron para iniciar los cribados de cristalización a escala nanogotas.

A



B

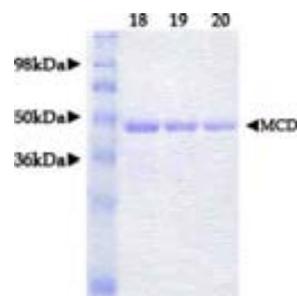


Fig.17 Cromatografía de intercambio Iónico y gel SDS-PAGE A) En azul se puede ver la absorbancia a 280nm. En verde la concentración de NaCl. B) Gel SDS-PAGE de las fracciones 18,19 y 20

Las variantes mutadas de MCD y la proteína marcada con seleniometionina se purificaron mediante el mismo protocolo, obteniendo los rendimientos que figuran en la tabla 2 (excepto que para la digestión de los mutantes se utilizó la proteasa Precission). Los rendimientos de los mutantes y de la proteína marcada con selenometionina fueron ligeramente inferiores a la silvestre.

Tabla.III Expresión y purificación de las variantes de MCD	
Variantes de MCD	Rendimiento¹
MCD Silvestre	2.2
C206S	1.0
C243S	1.8
C206S/C243S	1.6
E302A	0.9
SeMet	1.5

¹Rendimiento en mg por litro de cultivo

4.1.1 Análisis en solución de MCD

Para la cristalización de proteínas es muy importante tener una muestra homogénea y estable en solución. Es por ello que se analizó la estabilidad de MCD en solución mediante las técnicas de gel filtración, DLS y DSF.

El volumen de elución de MCD en gel filtración (11.2mL) muestra un estado tetramérico (219 kDa) en solución según calibración con recta patrón de los volúmenes de elución de los pesos moleculares estándares (Fig.18). Además, la muestra se conserva estable durante 2 o 3 semanas a 4°C analizada en gel SDS-Page y gel filtración.

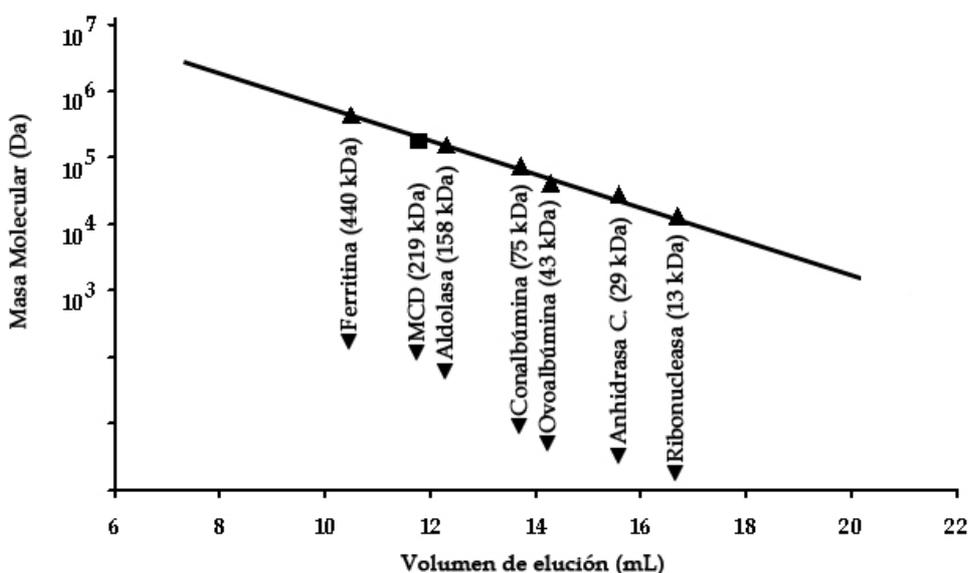


Fig.18 Análisis del estado oligomérico de MCD. Representación en gráfico semilogarítmico del volumen de elución en una SD200 10/300 respecto a las masas moleculares. Los triángulos corresponden a los patrones estándares. El cuadrado corresponde al volumen de elución de MCD (Peso teórico de MCD según ProtParam: 50.9kDa)

Los resultados de gel filtración son coherentes con los obtenidos en DLS, que muestran un rango de tamaño de partícula entre 175-243kDa para algunos de los tampones en el rango de pH de 6 a 7.5 (Tabla.3 marcados en negrita). Sin embargo, también se puede observar que algunos tampones en ese mismo rango de pH tienen tamaños de partícula bastante diferentes con el tamaño real. Este efecto de agregación quizá se haya producido durante la diálisis, ya que se observaron pequeños precipitados después del proceso. La polidispersidad de las muestras varía desde 0.85 del tampón 50mM Tris pH7 a 0.14 del tampón 50mM Tris pH7, 150mM NaCl (Tabla.IV). La polidispersidad es un indicador de la diversidad de especies en solución. Para la cristalización, lo ideal es tener una

misma especie homogénea, o sea una baja polidispersidad para favorecer la formación del cristal en el proceso de deshidratación de la gota.

Tabla.IV Resultados de los análisis con DLS de MCD con diferentes tampones		
Tampón	Peso molecular Estimado (kDa)¹	PDI²
50 mM Tris ph7	34000	0.85
50 mM Tris ph7 + 150 mM NaCl	175	0.14
50 mM Tris ph7 + 400 mM NaCl + 10% glicerol	>10 ⁸	0.70
50 mM Tris ph7 + 400 mM NaCl	>10 ⁷	0.28
1x PBS ph7.4	243	0.29
50 mM Bistris ph6.5 + 150mM NaCl	234	0.22
50 mM Mes ph6.5 + 150mM NaCl	1702	0.25
50 mM Hepes ph7.5 + 150mM NaCl	>10 ⁶	0.27
50 mM Caps ph9 + 150mM NaCl	>10 ⁷	0.37

¹Peso obtenido de cálculo estimado a partir del tamaño de partícula ² Dispersidad del tamaño de partícula

Adicionalmente, para comprobar el grado de plegamiento y estabilidad de MCD, se realizaron ensayos de desnaturalización con la técnica DSF y las condiciones descritas en metodología (apartado 3.2.6). La temperatura de desnaturalización de MCD en el tampón blanco (50mM Tris pH 7, 150mM NaCl) es de 53.92°C. Parece una temperatura razonable de desnaturalización para una proteína humana, ya que la temperatura corporal es 37°C aproximadamente. En la búsqueda de algún reactivo o aditivo que mejorase la temperatura de fusión de MCD y en consecuencia aumentase su estabilidad, ninguna de las condiciones probadas en el test de desnaturalización produjo una temperatura significativa superior a la reportada por el blanco.

4.2 Cristalización de MCD y análisis preliminar de los datos

4.2.1 Cristales iniciales de MCD silvestre

Los ensayos iniciales de cristalización de MCD silvestre a 20°C en placa Greiner dieron como resultado cristales en forma de aguja (tipo I) en la condición 1.8 M Sulfato de litio, 50mM Hepes ph 7,5, 0.05M Sulfato de Magnesio (Fig.19a). Sin embargo, la optimización en placas Linbro de 24

pozillos con las diferentes técnicas actuales en cristalización de proteínas no logró mejorar el tamaño de los cristales. La Formamida al 5% del kit de aditivos si mejoró ligeramente el tamaño de los cristales (Fig.19b). Aún con la mejora, no se pudo recoger ningún set de datos completo para su posterior procesado, ya que los cristales se dañaban fácilmente por la radiación durante la recogida en la línea microfoco ID23-2 del ESRF de Grenoble. El procesado de los pocos datos que se recogieron revelaron un cristal monoclinico con celda unitaria $a = 273.7$, $b = 81.1$, $c = 212.4$ $\beta = 100$.

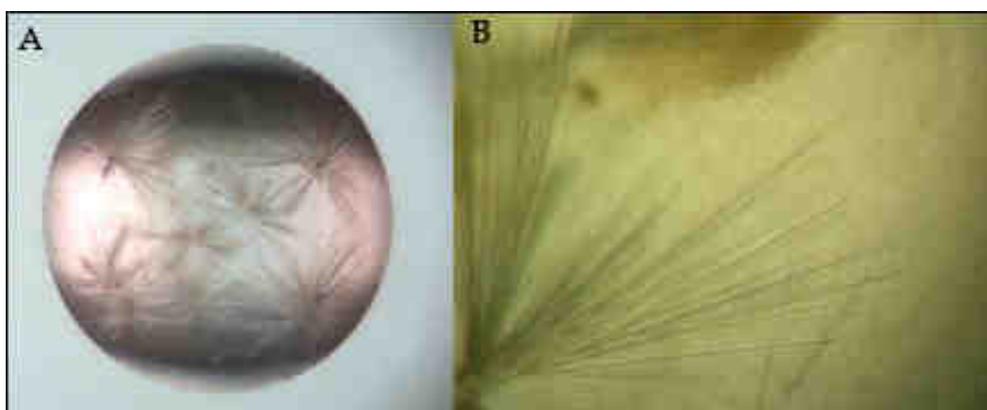


Fig.19 Cristales de MCD silvestre. (A) Cristales obtenidos previos a la optimización. (B) cristales de MCD después de añadir 5% de Formamida con grupo espacial C2.

4.2.2 Cristales con grupo espacial P1 de MCD SeMet

Después de los intentos frustrados en la cristalización de MCD silvestre se procedió a hacer nuevos cribados de cristalización con proteína marcada con SeMet. Los nuevos cribados reportaron los primeros cristales en forma de agujas en la condición D9 de la PAC2 17% PEG 3350, 0.1M sodium acetate pH 4.5 (Fig.20a). El cambio de precipitante a PEG2000 MME y la adición de citrato sódico 10 mM produjeron cristales monoclinicos de tipo II con celda unitaria $a=79.55$ Å $b=103.58$ Å $c=134.23$ Å $\alpha=95.40$ $\beta=90.11$ $\gamma=94.82$ (Fig.20b-c). El cristal contenía 8 subunidades en la unidad asimétrica y un contenido en volumen del solvente de 55.58 %. Las reflexiones de los mejores cristales llegaron hasta una resolución de 3.29 Å.



Fig.20 Cristales de MCD SeMet triclinicos. (A) Cristales iniciales de MCD SeMet. (B) y (C) Cristales de MCD SeMet después de optimizar (Dimensiones aproximadas: 0.025x0.05x0.2 mm)

4.2.2 Cristales con grupo espacial P₆₁22 de MCD SeMet

Las relaciones de volúmenes 1:2 y 1:4 en la misma condición que los cristales monoclinicos originaron un tercer tipo de cristal hexagonal de hasta 4.35 Å de resolución máxima en los experimentos de difracción (Fig.21). Después del análisis preliminar de los datos, se determinó que el cristal pertenecía a el grupo espacial P₆₁22 con celda unitaria $a=b=144.7 \text{ \AA}$ $c=493.0 \text{ \AA}$ conteniendo 4 subunidades en la unidad asimétrica y un contenido en volumen de solvente de 67.01%



Fig21. Cristales de MCD SeMet con grupo espacial P₆₁22. Las tres imágenes muestran cristales obtenidos en placas Linbro de 24 pozos después de optimizar con las relaciones de volúmenes (Tamaño aproximado de los cristales: 0.07x0.07x0.1 mm).

4.3 Obtención de fases iniciales

4.3.1 Procesado de datos

Los conjuntos de datos obtenidos del grupo triclinico se pudieron mezclar para obtener el máximo de completitud y mejorar la redundancia. Finalmente se logró un espectro a 3.29 Å con 0.37 de R_{sym}, 84.7 % de completitud y 1.65 de

redundancia en la última capa. La función de auto-rotación muestra tres ejes binarios perpendiculares a 90° , indicando que el cristal posee simetría no cristalográfica D2. No obstante, aunque en la función de autorotación solo se ven tres picos, hay dos moléculas en la unidad asimétrica ya que no se encontró ninguna pseudo-traslación (Fig.22).

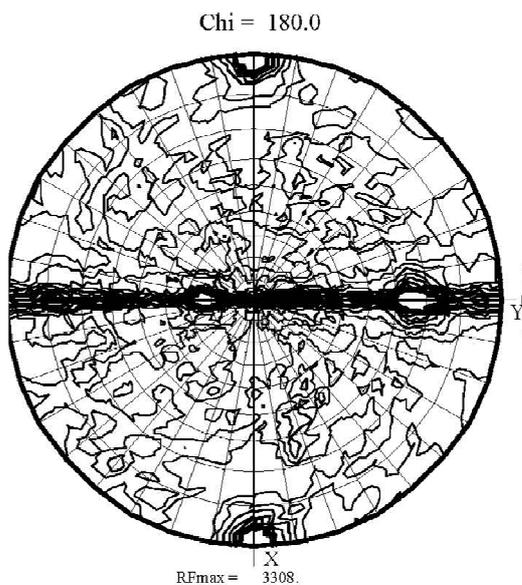


Fig.22 Función de auto-rotación para MCD SeMet P1 y Chi=180°. Los picos obtenidos son perpendiculares entre ellos mostrando simetría no cristalográfica D2.

De la misma forma, los datos mezclados del grupo hexagonal dieron unas estadísticas con valores de 0.63 de R_{sym} , 99.9% de completitud y 11.3 de redundancia en la última capa (mostrado en la tabla.VI). Para el grupo espacial $P6_122$ la función de auto-rotación muestra un eje senario y tres ejes binarios cristalográficos (Fig.23). No obstante hay una molécula en la unidad asimétrica y no se observan los picos correspondientes a la simetría no cristalográfica, probablemente porque están enmascarados por los cristalográficos.

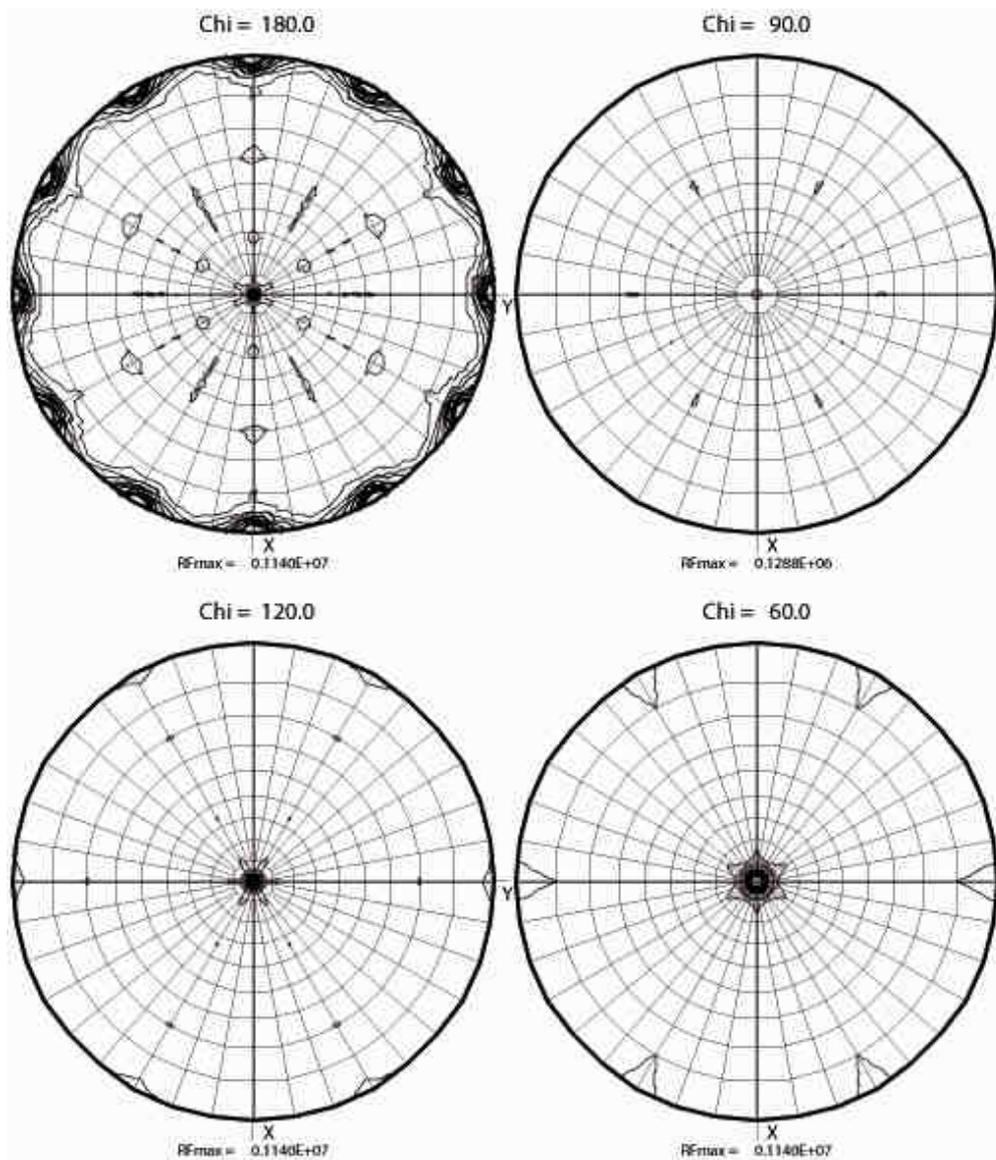


Fig.23 Función de auto-rotación para MCD SeMet P₆₁₂₂. Chi=180 muestra tres ejes binarios perpendiculares entre ellos y paralelos a x,y,z y otros dos generados a raíz de estos tres. Chi=60 y Chi=120 muestran un eje senario (característico del grupo espacial P6) y uno terciario respectivamente en el eje z.

4.3.2 Búsqueda de átomos con SHELXC/D y obtención del modelo inicial de densidad electrónica

La búsqueda inicial de los átomos de SeMet con los datos del experimento SAD del cristal triclinico a 3.29 Å no funcionó probablemente debido al bajo poder de faseado $d''/\text{sig} = 1.57$ a 8.0 Å (Tabla.V). El progama SHELXD no logró encontrar ninguna solución para la posición de los átomos de Seleniometionina con suficiente contraste como para considerarla buena.

Tabla.V

Resl.	Inf	- 8.0	- 6.0	- 5.0	- 4.7	- 4.5	- 4.3	- 4.1	- 3.9	- 3.7	- 3.5	- 3.29
N(data)		4500	6208	7822	3774	3083	3762	4493	5455	6532	8090	10266
<I/sig>		23.2	11.3	8.7	10.1	9.9	9.1	7.8	6.5	4.8	3.6	2.5
%Complete		99.8	99.9	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	98.0	97.6	90.9
<d"/sig>		1.57	1.20	1.09	1.10	1.09	1.10	1.08	1.02	1.00	0.95	0.87

Sin embargo, si que se logró encontrar una solución para la posición de los átomos con los datos del grupo espacial hexagonal P6₁22 (Tabla.VI). Utilizando SHELXD se encontraron 37 átomos de seleniometionina con ocupancias entre 0.48-1.00 y una figura de mérito de 0.37 a 4.35 Å (Tabla.VII) (La figura de mérito es un valor entre 0 y 1 que indica la calidad de la solución encontrada para el faseado).

Tabla.VI

Resl.	Inf	- 8.0	- 6.0	- 5.6	- 5.4	- 5.2	- 5.0	- 4.8	- 4.6	- 4.4	- 4.2	- 3.98
N(data)		3664	4700	1843	1134	1308	1523	1778	2105	2475	414	0
Chi-sq		0.94	1.18	1.10	1.17	1.19	1.08	1.15	1.12	1.07	1.00	
<I/sig>		53.3	17.2	8.0	7.0	7.0	6.4	6.5	5.2	4.1	2.6	0.0
%Complete		97.8	99.6	99.7	99.7	99.8	99.8	99.8	99.7	99.8	13.9	0.0
<d"/sig>		3.06	1.49	0.97	0.96	1.00	0.89	0.88	0.85	0.80	0.82	

Tabla.VII Posiciones de los átomos de Seleniometonina

```
REMARK TITLE good crystal
CRYST1 144.700 144.700 493.000 90.00 90.00 120.00 P 61 2 2 1
SCALE1 0.006911 0.003990 -0.000000 0.000000
SCALE2 0.000000 0.007980 -0.000000 0.000000
SCALE3 0.000000 0.000000 0.002028 0.000000
REMARK Atoms in chain A
```

				x	y	z	OCC		
ATOM	1	SE	SUB A	1	61.634	93.870	20.420	1.012	17.61
ATOM	2	SE	SUB A	2	88.978	59.474	-2.767	0.912	17.32
ATOM	3	SE	SUB A	3	100.152	99.891	31.574	1.002	16.99
ATOM	4	SE	SUB A	4	80.907	96.945	-12.923	0.912	18.00
ATOM	5	SE	SUB A	5	88.923	94.442	-8.369	1.002	18.78
ATOM	6	SE	SUB A	6	81.206	77.715	50.038	0.762	18.02
ATOM	7	SE	SUB A	7	64.921	125.135	25.863	0.882	19.23
ATOM	8	SE	SUB A	8	91.847	56.893	6.877	0.842	18.05
ATOM	9	SE	SUB A	9	78.729	87.164	42.951	0.972	17.36
ATOM	10	SE	SUB A	10	89.895	68.269	39.461	0.672	18.47
ATOM	11	SE	SUB A	11	91.664	90.924	44.460	0.822	18.71
ATOM	12	SE	SUB A	12	73.646	107.952	-18.439	0.992	17.67
ATOM	13	SE	SUB A	13	87.840	63.030	28.259	1.002	17.72
ATOM	14	SE	SUB A	14	72.646	116.001	-24.078	0.862	18.42
ATOM	15	SE	SUB A	15	62.823	91.754	30.860	0.652	18.78
ATOM	16	SE	SUB A	16	92.585	60.143	20.694	0.882	17.58
ATOM	17	SE	SUB A	17	106.585	105.396	22.120	0.822	18.04
ATOM	18	SE	SUB A	18	63.373	101.954	30.209	0.842	18.28
ATOM	19	SE	SUB A	19	98.404	99.674	21.484	0.672	18.53
ATOM	20	SE	SUB A	20	95.382	83.351	-6.645	0.862	18.60
ATOM	21	SE	SUB A	21	50.532	75.025	12.303	0.512	19.37
ATOM	22	SE	SUB A	22	88.730	81.500	38.818	0.812	18.89
ATOM	23	SE	SUB A	23	51.531	67.399	1.693	0.712	19.30
ATOM	24	SE	SUB A	24	52.887	36.216	2.205	0.742	19.82
ATOM	25	SE	SUB A	25	45.669	93.219	12.315	0.202	18.96
ATOM	26	SE	SUB A	26	121.608	103.034	34.806	0.112	18.71
ATOM	27	SE	SUB A	27	89.838	73.317	9.964	0.162	18.59
ATOM	28	SE	SUB A	28	65.459	93.472	-15.124	0.202	18.47
ATOM	29	SE	SUB A	29	105.414	108.265	-31.401	0.132	18.68
ATOM	30	SE	SUB A	30	-17.079	64.613	443.627	0.572	19.56
ATOM	31	SE	SUB A	31	-9.529	68.956	91.897	0.672	19.90
ATOM	32	SE	SUB A	32	-15.077	72.467	232.700	0.552	19.29
ATOM	33	SE	SUB A	33	-17.183	68.718	84.533	0.542	18.59
ATOM	34	SE	SUB A	34	-10.695	55.437	486.179	0.522	19.59
ATOM	35	SE	SUB A	35	-12.858	60.116	451.269	0.482	19.75
ATOM	36	SE	SUB A	36	-5.104	59.077	443.997	0.492	18.80
ATOM	37	SE	SUB A	37	-14.862	43.115	485.394	0.482	18.36

Se refinaron las posiciones de los átomos con RESOLVE y se encontró que estaban relacionados por operadores de simetría dentro de la unidad asimétrica, resultando en un cristal con simetría no cristalográfica D2 (tres ejes binarios perpendiculares entre ellos). Finalmente se aplicaron los operadores de simetría y se generó un mapa inicial a 4.35 Å (Fig.24).

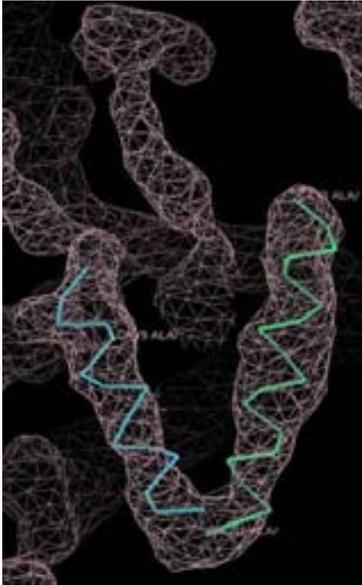


Fig.24 Mapa preliminar experimental de 2Fc-Fo a 4.35 Å (1.0σ). En azul y verde se han modelado dos helices alfa con Coot para tener una referencia del tamaño de los tubos de densidad.

4.4 Extensión de fases de 4.35 Å a 3.29 Å y construcción del modelo inicial de proteína

4.4.1 Utilización de máscaras de densidad electrónica

Los operadores de simetría no cristalográfica nos proporcionaron una herramienta útil para encontrar el centro de masas de la molécula en el cristal de grupo espacial P₆₁22 (tetrámero). Se refinó el centro de masas con DM y se utilizó para generar un mapa y una máscara de densidad electrónica cubriendo la unidad asimétrica del cristal con maprot (Stein et al., 1994) (Fig.25).

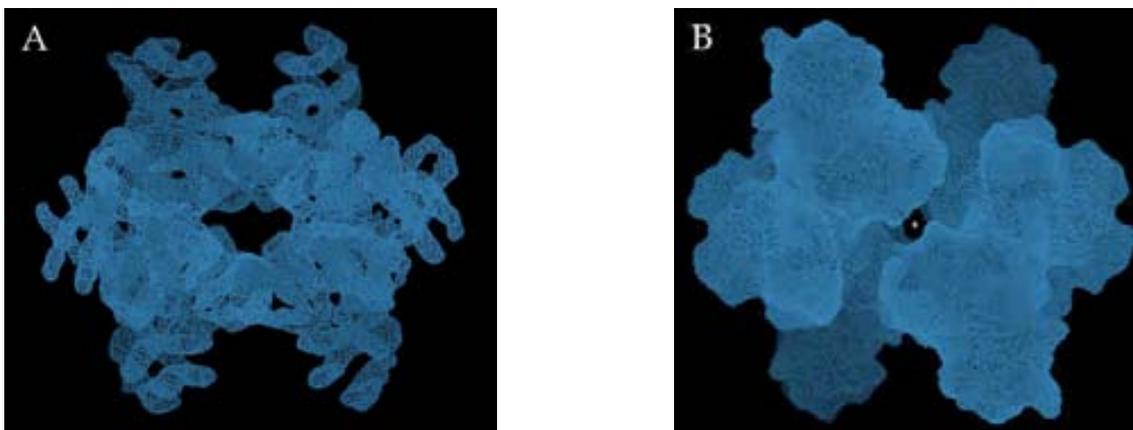


Fig.25 Máscara y mapa de densidad electrónica del cristal P₆₁22. (A) Mapa de densidad electrónica de la unidad asimétrica del cristal P₆₁22 a σ_1 . (B) Máscara que cubre la unidad asimétrica del cristal después de modificarla con maprot. El punto blanco indica el centro de masas de la molécula.

4.4.2 Búsqueda de la solución en P1 por reemplazo molecular y construcción del modelo

Utilizando el mapa de densidad como modelo de búsqueda, Phaser encontró las matrices de rotación y traslación de P6₁22 a P1. Estas matrices, junto a la máscara de densidad electrónica se utilizaron en DM-multi para el promediado de cristales entre P6₁22 y P1 con unos valores finales de correlación de cristales alrededor de 0.8-0.9. Después de 100 ciclos de promediado, se obtuvo el primer mapa de densidad a 3.29 Å (Fig.26).

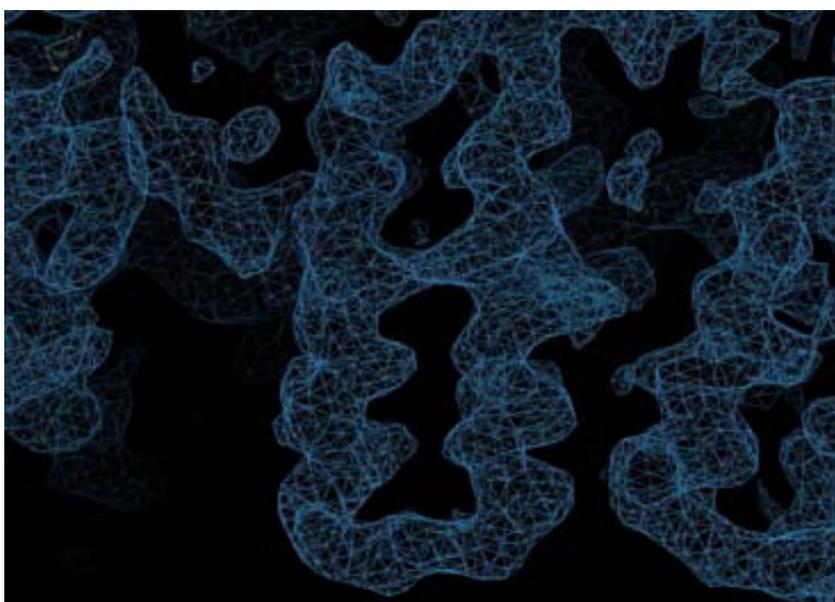


Fig.26 Mapa de densidad electrónica inicial a 3.29 Å (1.0σ) obtenido del promediado de cristales con DM. Se pueden ver las cadenas laterales de los aminoácidos.

La construcción del modelo se realizó con ciclos manuales de Coot y Refmac, resultando en una estructura y mapa con valores de Rfree y Rfactor de 0.34 y 0.29 respectivamente. Llegados a este punto fue necesario disminuir las restricciones de simetría no cristalográfica para seguir mejorando el modelo con Refmac ya que el programa se quedó clavado por problemas de asimetría estructural entre las subunidades del heterodímero. Al disminuir las restricciones los siguientes ciclos manuales de Coot y Refmac lograron dejar el modelo en 0.28 y 0.26 (Rfree y Rfactor). Finalmente el ciclo realizado con el programa Buster refinó los valores de Rfree y Rfactor en 0.26 y 0.24 (Tabla.VIII).

Table VIII		
Data collection and Refinement Statistics		
	SAD	SAD
Data collection		
Space group	P6 ₁ 22	P1
Cell dimensions		
a, b, c (Å)	144.70, 144.70, 493.00	80.42, 103.31, 134.24
α, β, γ (°)	90.00, 90.00, 120.00	95.32, 90.22, 94.46
Unique reflections	37728 (2787)	63973 (4164)
Resolution (Å)	47.36-4.36 (4.47-4.36)	68.41-3.29 (3.48-3.29)
Wavelength (Å)	0.9791	0.9786
Rsym (%) ^b	0.17 (0.63)	0.15 (0.37)
I/σI	12.42 (2.69)	7.87 (2.18)
Completeness (%)	99.90 (99.90)	98.20 (84.7)
Redundancy	12.35 (11.30)	1.93 (1.65)
<d''/sig>	3.07 ^{os} (0.81) ^{is}	1.57 ^{os} (0.87) ^{is}
B-Model Refinement statistics		
Resolution		68.41-3.29 (3.48-3.29)
No.reflections		63973 (4164)
R _{cryst} (%) ^c		24.44 (26.47)
R _{free} (%) ^d		26.70 (31.44)
No. residues		3632
No. ligands		4
Solvent content (%)		55
Non-H atoms		28162
Av. B-factor (Å ²)		48.02
Coor. Error (Å) ^e		0.56
Rms dev.bonds (Å)		0.009
Rms dev.angles (°)		1.21
^a Values in parentheses correspond to the highest resolution shell. ^b $R_{sym} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle }{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$, where $I_i(hkl)$ is the intensity of an observation and $\langle I(hkl) \rangle$ is the mean value of observations for a unique reflection. ^c $R_{cryst} = \frac{\sum_h F_o(h) - F_c(h) }{\sum_h F_o(h) }$, where F_o and F_c are the observed and calculated structure-factor amplitudes, respectively. ^d R_{free} was calculated with 5% of data, which was excluded from the refinement. ^e Based on maximum likelihood. <d''/sig> = $\frac{ F_{hkl} - F_{-h-k-l} }{\sigma(F_{hkl} - F_{-h-k-l})}$: averaged of the anomalous difference d'' divided by its standard deviation. ^{os} Outer shell ^{is} Inner shell		

4.5 Descripción general de la estructura de MCD y oligomerización

4.5.1 Nuevo plegamiento estructural en el dominio N-Terminal y dominio C-Terminal de la superfamilia de las GCN5-Histona N-acetiltransferasas

La estructura cristalina de MCD humana incluye desde el residuo Met40 hasta la Leu493. A pesar de la relativa baja resolución a 3.29 Å, la mayoría de los residuos se pudieron identificar y colocar en el cristal triclinico (Fig.27). Los siguientes residuos no se colocaron debido a la ausencia de densidad

electrónica (Cadena B: 59-63, 345-352, 491-493 ; Cadena C: 59-63, 346-352, 492-493; Cadena D: 346-352, 491-493; Cadena E: 59-63, 345-352, 491-493; Cadena F: 345-351, 493; Cadena G: 345-351, 491-493; Cadena H: 59-63, 348-351, 492-493.

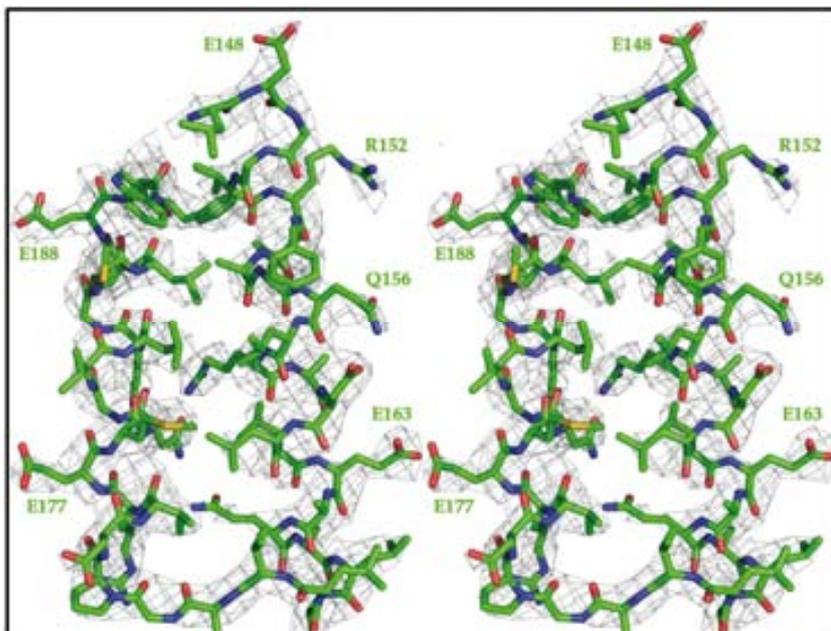
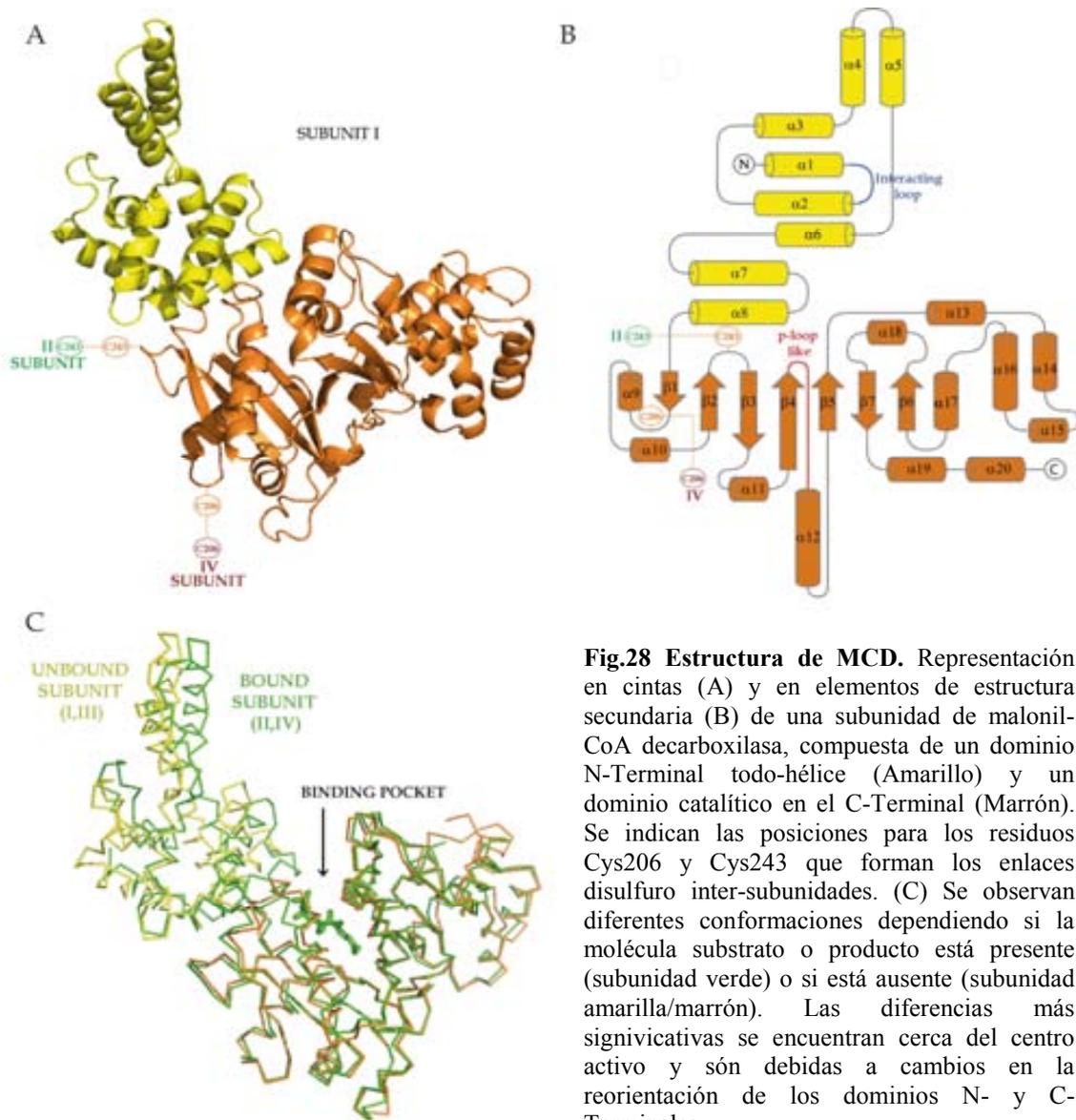


Fig.27 Representación en estereo de la densidad electrónica del mapa 2Fo-Fc, a 1 σ , del cristal triclínico de MCD. Helices α 7 y α 8 del N-Terminal

Cada subunidad de MCD esta organizado con estructura todo-alfa en el N-Terminal y un dominio catalítico en el C-Terminal exhibiendo un plegamiento típico de la familia de las GCN5-Histona N-acetiltransferasas (GNAT) (Fig.28a-b). En los dos cristales, las subunidades adoptan dos conformaciones marcadamente diferentes (Fig.28c), que inicialmente ocasionaron problemas con el refinado cuando se aplicaba simetría no cristalográfica.

Los monómeros con conformaciones diferentes entre sí estan unidos a través de una larga superficie, produciendo lo que se denomina un heterodímero estructural (Fig29a-c). La asociación de un par de los denominados heterodímeros estructurales produce un tetrámero molecular. La unidad asimétrica de las formas cristalinas triclínica y hexagonal contienen dos y un tetrámero de MCD, respectivamente. La estructura tetramérica está de acuerdo con los resultados en gel filtración que muestran un estado tetramérico para MCD en solución (Fig.18). Los heterodímeros de cada tetrámero están

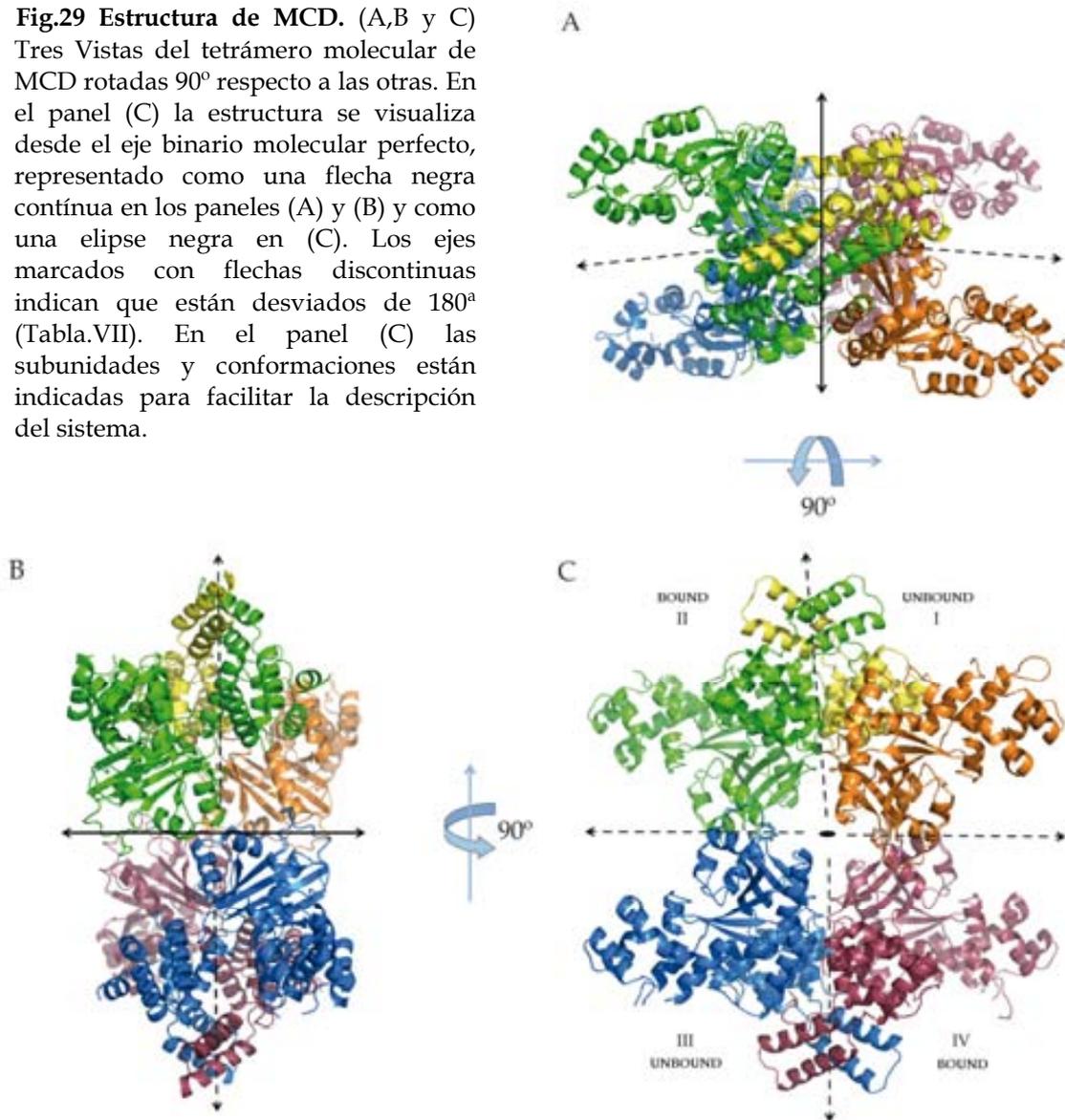
relacionados por un eje binario molecular (simetría molecular C2) con un ángulo de rotación cercano a 180° (Tabla.IX) (representado como una flecha negra continua y como una elipse negra en la figura 29).



Los demás ejes de rotación de la superposición de las diferentes subunidades en el tetrámero (representados con flechas discontinúas en la figura 29a-c) presentan desviaciones significativas de 180° (Tabla.IX). Estos ejes podrían convertirse en ejes binarios precisos si no existiesen las diferencias estructurales entre las dos conformaciones de los monómeros que forman los

heterodímeros. La simetría molecular del tetrámero se incrementaría de un grupo C2 (un eje binario) a un D2 (tres ejes binarios perpendiculares entre ellos).

Fig.29 Estructura de MCD. (A,B y C) Tres Vistas del tetrámero molecular de MCD rotadas 90° respecto a las otras. En el panel (C) la estructura se visualiza desde el eje binario molecular perfecto, representado como una flecha negra continua en los paneles (A) y (B) y como una elipse negra en (C). Los ejes marcados con flechas discontinuas indican que están desviados de 180° (Tabla.VII). En el panel (C) las subunidades y conformaciones están indicadas para facilitar la descripción del sistema.



El dominio N-terminal de cada monómero, desde la Met40 al Trp189, contiene ocho helices organizadas como un “bundle” de cuatro helices antiparalelas ($\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3, \alpha 6$) con dos pares de helices insertadas ($\alpha 4-\alpha 5$ y $\alpha 7-\alpha 8$). Este tipo de organización puede ser la primera representación de la variante típica del “bundle” de cuatro helices, ya que ningún otro dominio de

proteínas presenta una topología equivalente según los resultados de búsqueda en el servidor DALI (Holm et al., 2006).

El dominio C-terminal, compuesto del Phe190 a la Leu490, presenta una topología muy precisa del dominio GNAT de la familia de las Histonas N-acetiltransferasas, además de incorporar un “cluster” de siete helices ($\alpha 13$ - $\alpha 17$ y $\alpha 19$ - $\alpha 20$) (Fig.28a). Las diferencias más pronunciadas entre las dos conformaciones adoptadas por las subunidades surgen de los reordenamientos de la cavidad del centro activo (descrito más abajo) y de cambios en las disposiciones espaciales de los dominios N- y C-Terminales, que esencialmente consisten en un desfase en la rotación del ángulo al superponer los dominios N- y C-Terminales de ambas subunidades (Tabla.IX).

Tabla IX
Superposición de las subunidades y dominios de MCD (código PDB 4F0X)

Superimposition rmsd (Å)/angle (°)				
Nter(40-189) MCD	Unbound I	Bound II	Unbound III	Bound IV
Unbound I		0.84/178.9	0.04/178.1 ⁽¹⁾	0.83/176.5
Bound II			0.83/177.9	0.04/177.9 ⁽²⁾
Unbound III				0.84/178.9
Bound IV				
Cter(190-493) MCD				
Unbound I		1.07/168.9	0.45/179.9 ⁽¹⁾	1.19/175.3
Bound II			1.03/176.1	0.35/179.2 ⁽²⁾
Unbound III				0.89/169.6
Bound IV				
Monomers MCD				
Unbound I		2.21/177.2	0.63/179.7 ⁽¹⁾	2.01/175.0
Bound II			2.17/175.9	0.57/179.4 ⁽²⁾
Unbound III				1.86/173.3
Bound IV				
mMCD\MCD	Unbound I (MCD)		Bound II (MCD)	
A (2YGW)	1.89		1.05	
B (2YGW)	1.34		2.40	
Heterodimers	I/II (MCD)		II/I (MCD)	
A/B (2YGW)	2.85		1.58	
Monomer mMCD	B (2YGW)			
A (2YGW)	1.97/178.6			

- (1) Monómeros I y III de MCD no unidos a sustrato están relacionados por un eje binario de rotación
- (2) Similarmente para los monómeros unidos a sustrato II y IV

Mientras el trabajo presente estaba en progreso, las coordenadas de la estructura cristalina de malonil-CoA descarboxilasa mitocondrial humana (de aquí en adelante referida mMCD) fueron liberadas en el PDB. La estructura de mMCD se obtuvo a partir de los datos de un cristal ortorómbico con grupo espacial C222₁, y contiene dos subunidades en la unidad asimétrica. Similarmente a lo que se ha descrito en este trabajo, el dímero de mMCD es un heterodímero estructural que puede superponerse sobre el heterodímero de MCD exhibiendo unas desviaciones r.m.s.d (del inglés root mean square deviation) de 1.6Å y 2.9Å para las dos posibles superposiciones (Tabla.IX). El tetrámero molecular lo completa un eje binario cristalino produciendo

prácticamente la misma organización que el tetrámero de MCD, reforzando así los resultados de las peculiares características estructurales del enzima.

4.6 El centro activo de MCD

4.6.1 Comparación con la Histona N-acetiltransferasa GNAT, otra enzima con actividad malonil-CoA descarboxilasa en cyanobacterium Lyngbya

La actividad descarboxilasa en un dominio GNAT fue inicialmente descrito en una policétido sintasa (CurA GNAT) (código PDB 2REE y 2REF), mostrando actividad bifuncional descarboxilasa/S-acetiltransferasa (Gu et al., 2007). Basados en esta observación y teniendo en cuenta que no se ha descrito ninguna GNAT con actividad únicamente descarboxilasa, parecería razonable pensar que el sitio catalítico de MCD ha de parecerse al de CurA GNAT y residir dentro del plegamiento exhibido por la familia GNAT. (Fig.30).

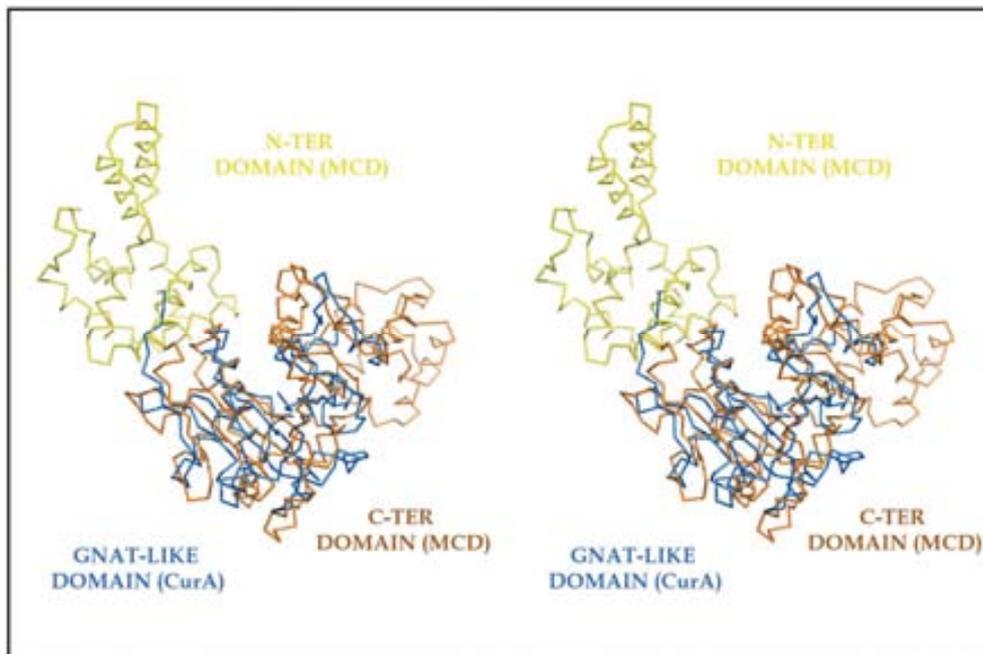


Fig.30 Dominio C-Terminal de malonil-CoA descarboxilasa. (A) Vistas en estéreo de la superposición de MCD (Representado como en la figura 28c en amarillo y marrón para el N- y C-Terminal respectivamente) sobre el dominio GNAT de la policétido sintasa CurA (en azul). Aún y la baja identidad de secuencia, los dos dominios GNAT se superponen con gran precisión.

Aunque la identidad de secuencia total de MCD respecto CurA GNAT es solamente de un 13% y el r.m.s.d del alineamiento para los 181 átomos C α es 3 Å, la identidad y geometría estructural de los residuos esenciales para la descarboxilación en CurA GNAT (en particular, Thr355 y His 389 interactuando con Tyr419) es muy similar a MCD (Ser329 y His423 interaccionando con Tyr456. (Fig.32).

La superposición de la estructura de MCD con los complejos de GNAT y substratos de CoA, en particular con el complejo formado entre CurA GNAT y malonil-CoA (código PDB 2REF), indica que el malonil-CoA (Fig.31) debería unirse en la apertura formada entre las hojas betas β 4 y β 5, interaccionando mayoritariamente con los átomos de la cadena principal desde la hoja β 4 hasta la helice α 12 (Fig.32). Las diferentes conformaciones observadas en los heterodímeros estructurales parecen facilitar la unión del substrato malonil-CoA a una de las subunidades (la conformación B) y dificultar la unión a la otra subunidad que forma el heterodímero (la conformación U).

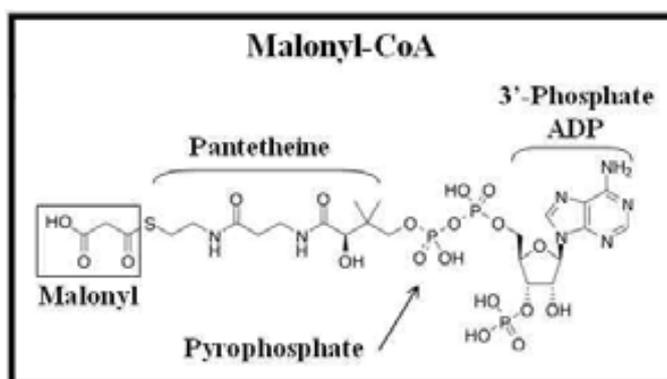


Fig.31 Estructura química del malonil-CoA. El malonil-CoA está formado por una base Adenosina bifosfato (ADP), un grupo pirofosfato, una zona central panteteína y un malonil.

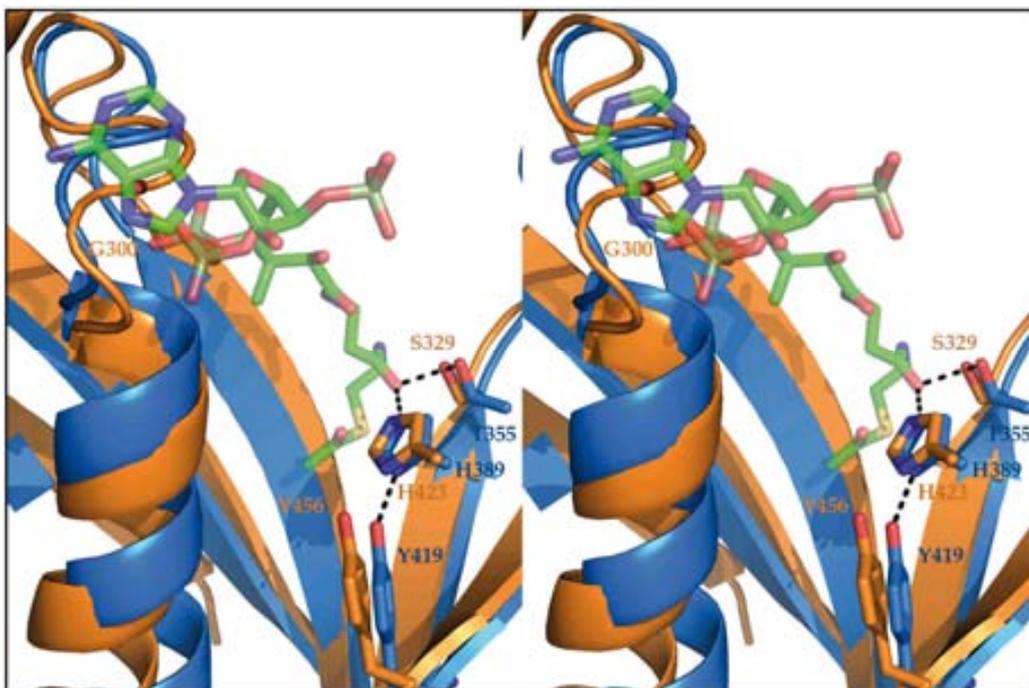


Fig.32 Vistas estereo ampliada de los centros activos de MCD y CurA. La organización de residuos que parece ser esencial para la actividad descarboxilasa en CurA (Thr355, His389 interaccionando con Tyr 419) no presenta cambios significativos en MCD (Ser329, His423 interaccionando con Tyr 456). La molécula de malonil-CoA del complejo con CurA (código PDB 2REF) sugiere que el lugar de unión para la base nitrogenada del cofactor necesita algunos reordenamientos en la configuración real para eliminar problemas estéricos con el lazo que va de $\alpha 12$ a $\beta 4$.

Se encontró densidad electrónica consistente con una ocupancia parcial correspondiente a la parte central del CoA (panteteína pirofosfato) en los conformeros B (subunidades II y IV de la figura 29c), pero no en los conformeros U (subunidades I y III de la figura 29c). En mMCD se observó una situación similar, con una región de densidad electrónica bien definida aunque no modelada en las coordenadas de 2YGW solo mostrada en las subunidades con conformación B (Fig.33).

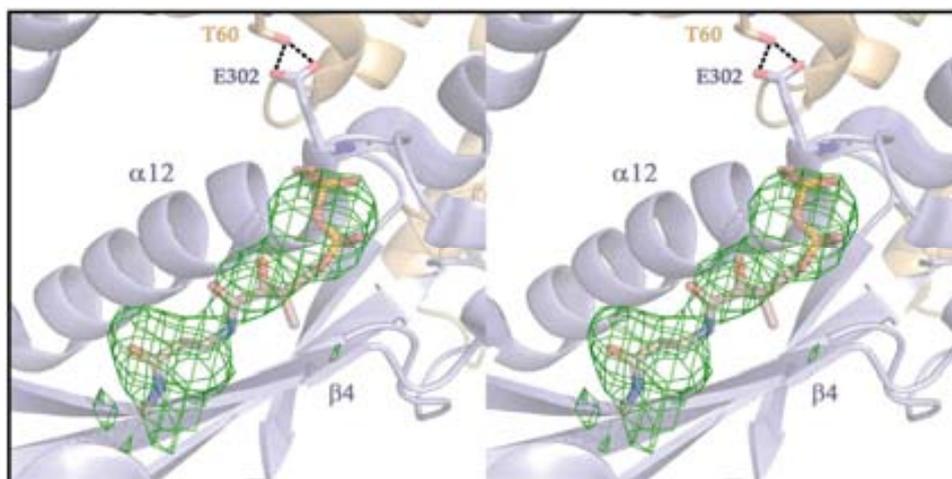


Fig.33 Vista estéreo del mapa de diferencia Fo-Fc (a 2.50) del centro activo de mMCD (código PDB 2YGW) correspondiente a la subunidad que presenta conformación B o bound. En marrón, estructura central del CoA correspondiente a la panteteína pirofosfato modelado con Coot. En verde, mapa de diferencia Fo-Fc observado solo en el conformero B.

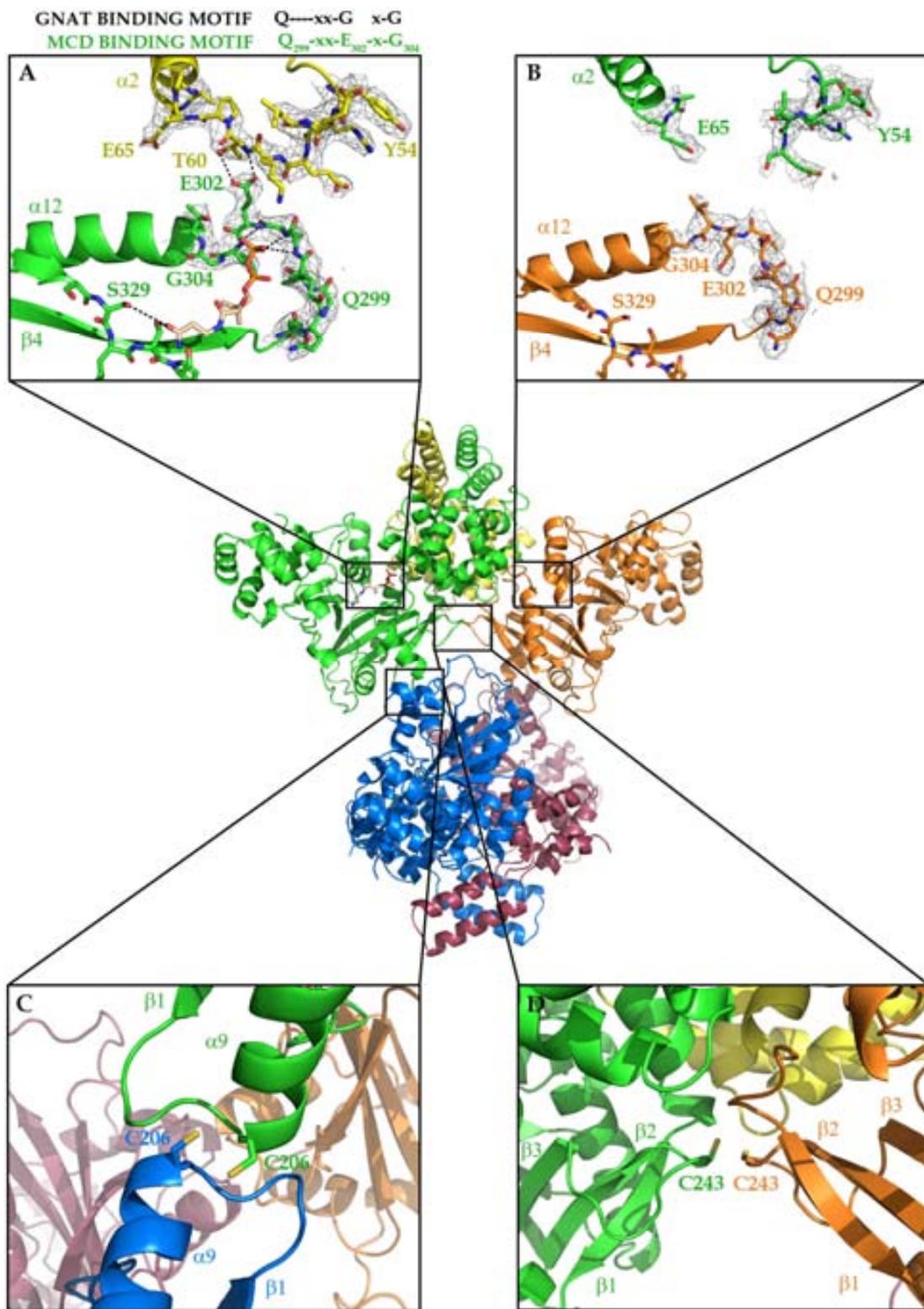
El fragmento de CoA modelado en MCD tiene una conformación doblada mostrando un ángulo agudo entre los planos amida de la zona central de la panteteína, similar a lo que se observa en los complejos CoA-GNAT (Fig.33). Una característica inusual del derivado de CoA unido a GNAT es la interacción de los fosfatos con las amidas de la cadena principal del “P-loop” encontrado en el motivo de unión de CoA (R/QXXGXG/A, donde X indica cualquier residuo), en lugar de encontrarse unidos a cadenas laterales cargadas positivamente como Lys o Arg.

En MCD la secuencia correspondiente al motivo de unión de CoA (Q₂₉₉XXE₃₀₂XG₃₀₄), contiene un residuo glutámico (Glu302) reemplazando la glicina central en el motivo estándar. El residuo Glu302 presenta diferentes conformaciones para la cadena principal dependiendo si está en la conformación B o U (del inglés bound o unbound). En la conformación B, la cadena principal del Glu302 presenta un ángulo de torsión característico de hélix levógira ($\Phi \sim 60^\circ$, $\Psi \sim 20^\circ$), normalmente favorecida solo para las glicinas según el gráfico de Ramachandran. Además, la cadena lateral del Glu302 está bien definida, tal vez por la rigidez que le confiere la interacción con la Thr60

del loop Tyr54-Glu65 formado entre la hélice $\alpha 1$ y $\alpha 2$ del dominio N-Terminal de la subunidad vecina en el heterodímero estructural (Fig.34a).

Sin embargo, en la conformación U, el Glu302 adopta una conformación más relajada para el ángulo de torsión de la cadena principal ($\Phi \sim -75^\circ$, $\Psi \sim 180^\circ$) y la cadena lateral no presenta una densidad electrónica tan abundante, aunque parece ocupar parcialmente el lugar de unión dónde se ubicaba el pirofosfato del CoA en la subunidad con conformación B. En otras palabras, la cadena lateral del Glu302 podría interferir con la unión del sustrato en la conformación U (Fig.34b). Además, al dejar de interactuar los residuos Glu302 y Thr60 se libera el lazo Tyr54-Glu65 y se desordena parcialmente, lo que provoca que otra región de la proteína tenga dos conformaciones diferentes, dependiendo de si el sustrato está presente o no el centro activo. El lugar de unión para la porción adenosina del CoA en MCD ha de ser bastante diferente a CurA GNAT ya que una disposición similar ocasiona problemas estéricos con el lazo que va de la hélice $\alpha 12$ hasta la hoja $\beta 4$ (Fig. 32). Desafortunadamente, los mapas de densidad electrónica de ambas estructuras cristalinas MCD y mMCD no proporcionan ninguna pista sobre la posible conformación alternativa para la disposición de la adenosina en la interacción con el lazo anteriormente comentado. Además, los intentos para producir complejos de cristales de MCD incubados con diferentes derivados de CoA no han reportado ningún cristal adecuado para los experimentos de difracción.

***Fig.34 Interacciones inter-subunidades en malonil-Coa descarboxilasa.** El lazo de unión del pirofosfato (P-loop) en MCD presenta diferencias importantes entre las subunidades con la conformación B o U (cajas A y B, respectivamente). El motivo de unión estándar de CoA R/QXXGXG/A en el P-loop, corresponde al motivo de unión $Q_{299}XXE_{302}XG_{304}$ en MCD humana. Parece que el reemplazo de la glicina central del motivo estándar por el Glu302 en MCD humana ocasiona cambios en el funcionamiento de el P-loop. En el conformero B, la cadena principal del Glu302 adopta una conformación desfavorable estabilizada por las interacciones con el lazo Tyr54-Glu65 de la subunidad vecina. En el conformero U, el Glu302 exhibe una conformación de la cadena principal más estabilizada. El lazo Tyr54-Gly65 está desordenado y la cadena lateral del Glu302 ocupa parcialmente, el mismo sitio que estaría ocupado por el pirofosfato, contribuyendo a la liberación del cofactor. Cajas C y D muestran los entornos de los residuos Cys206 y C243 respectivamente, los cuales dan lugar a los enlaces disulfuro Cys206-Cys206 y Cys243-Cys243



*Pie de figura en página anterior

4.7 Interacciones entre subunidades y enlaces disulfuro en MCD

4.7.1 Interacciones tipo I-II y interacciones tipo I-IV

Las subunidades de MCD en el tetrámero no interactúan a través del eje binario (Fig.29c), pero sí que lo hacen a través de los otros ejes como resultado de una simetría molecular pseudo D₂. Las interacciones tipo I-II (entre subunidades I y II y también entre III y IV) estabilizan la formación del heterodímero estructural y consisten en una extensa (3964 Å) superficie interfase hidrofóbica que involucra principalmente los dominios N-terminales.

Por el contrario, las interacciones tipo I-IV (entre subunidades I y IV y subunidades II-III) consisten en una bastante más pequeña superficie interfase (1051 Å) involucrando exclusivamente los dominios C-Terminales (Fig.29a-c y 34c-d). La proximidad de los residuos cisteína en ambas interfases sugieren la posibilidad de la formación de puentes disulfuro (Cys206-Cys206 entre la interfase tipo I-IV y Cys243-Cys243 entre la interfase tipo I-II) uniendo así covalentemente los cuatro monómeros en el tetrámero (Fig.29c y 34c-d). Las condiciones que se han utilizado para la expresión de SeMet requerían reductores para prevenir la oxidación de SeMet, probablemente la consecuencia directa de este protocolo es que los puentes disulfuro no están formados en la estructura de MCD. Sin embargo, si hay evidencia de una formación parcial de los puentes disulfuro en la estructura de mMCD. Los puentes disulfuro en mMCD no parecen ocasionar grandes cambios estructurales, y los átomos de la cadena principal mantienen las posiciones relativas intactas tanto en la zona de puente disulfuro formado como en la que no se ha formado.

4.7.2 Análisis de la formación de puentes disulfuro con la incubación de H₂O₂

Se analizó la formación de puentes disulfuro en MCD utilizando geles SDS no reductores para MCD silvestre, los dos mutantes simples (C206S, C243S) y el doble mutante (C206S/C243S) añadiendo diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno (Fig.35a-b). La forma silvestre monomérica de la

proteína se convirtió rápidamente, aunque de forma parcial, hacia tetrámero sin la formación intermedia de los dímeros, similar a lo que le ocurrió a la variante mutada C243S en menor medida. Mientras la variante mutada simple C206C y la doble permanecían sin aparecer los tetrámeros. Por lo tanto, la formación de la unión disulfuro entre subunidades parece ser un proceso de todo (tetrámero) o nada involucrando los residuos Cys206 y C243. La formación de los tetrámeros en C243S podría ser debido a la gran superficie de contacto entre la interfase tipo I-II.

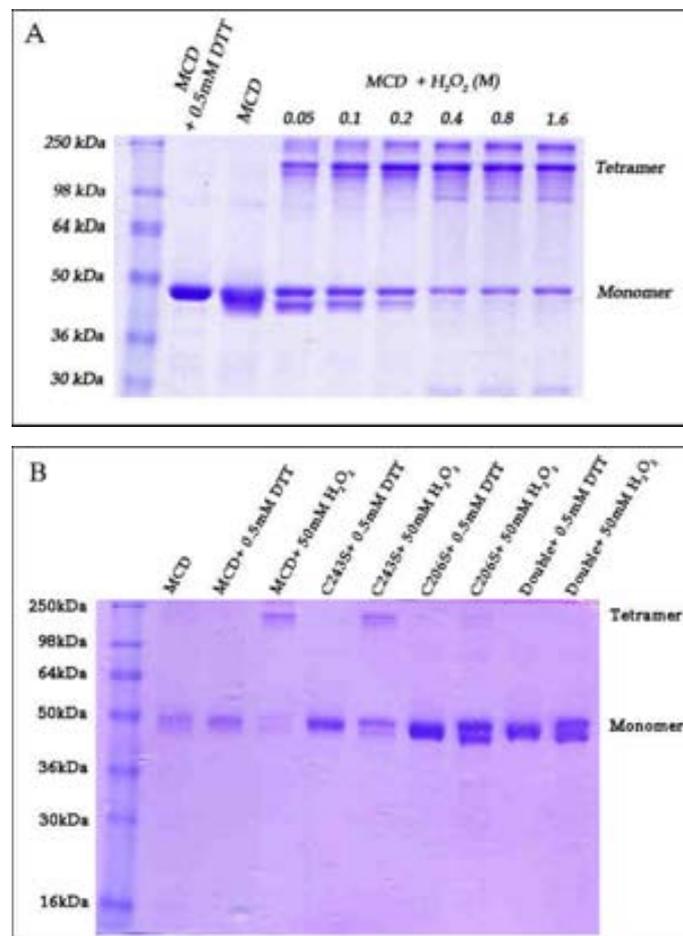


Fig.35 Formación de puentes disulfuro en malonil-CoA descarboxilasa. SDS PAGE 12% Acrilamida sin β -mercaptoethanol. (A) Muestras de MCD Silvestre incubadas con diferentes concentraciones de H_2O_2 , sin H_2O_2 y con DTT para comparar. Se observa un proceso cooperativo de todo o nada en la formación de los tetrámeros. (B) Muestras de MCD silvestre y variantes mutadas incubadas de la misma forma que en A. Se observa el mismo comportamiento para el doble mutante y para el mutante simple C206S que para MCD silvestre. La presencia de tetrámeros en el mutante simple C243S es difícil de interpretar. Cys206 está conservado en todos los vertebrados mientras que C243 solo entre mamíferos (Fig.36)

HUMAN T $\beta 2$ TT $\beta 3$ $\alpha 11$
 240 # 250 260 270
 HUMAN Y..RRCYFHSRCSITPGDPLVVLHVAITGDISSNICAVLVEKHPFSET.....
 RAT Y..RRCYFFSHCSITPGDPLVVLHVAITGDISSNICAVLVEKCPFSET.....
 GOOSE Y..RRCYFFSHCAIPGEPPLIILHVAITSDISSLIQSVLXDVESLET.....
 FROG Y..RRCYMFHASEAMPGEPLIVLHVAIQNISGSIQAVLVDIPSSSEA.....
 FISH N..RRCYAFTHASMPGEPPLIVLHVAITGDISSNICAVLVEKHPFSET.....
 WORM N..RRCYFVFMHEAMAREPLVVLHVAITGDISSNICAVLVEKHPFSET.....
 PLANT G..RRCYFVFMHEAMAREPLVVLHVAITGDISSNICAVLVEKHPFSET.....
 FUNGI G..RRCYFVFMHEAMAREPLVVLHVAITGDISSNICAVLVEKHPFSET.....
 BACTERIA AD..RRCYAFTHASMPGEPPLVFMVAITGDISSNICAVLVEKHPFSET.....
 PROTOZOO AKNRRHLFAFHFPAVVEEPLVAVCAITRGTARSVITLGRPHFFPSVQERQNDQLGAANGEVADACSGARK

HUMAN TT $\beta 4$ $\alpha 12$ $\beta 5$
 280 290 300 310 320 330
 HUMAN .EEKNKITAALFYSLITQQLLGLVGLGFLIKRVRRELQREFP.....HLGLVFBSSSPDPFTK...
 RAT .EEKNRIAAAVIFYSLITQQLLGLVGLGFLIKRVRRELQKEFP.....HLGLVFBSSSPDPFTK...
 GOOSE .EDAEEKITTAIFYSLITQQLLGLVGLGFLIKRVRRELQKDLF.....OILEAFSSSSPPGFTK...
 FROG .EDGNKIQAIFYSLITQQLLGLVGLGFLIKRVRRELQVEFP.....OILEAFSSSSPPGFTK...
 FISH .KDVNKINAIFYSLITQQLLGLVGLGFLIKRVRRELQSEFP.....HMACFFSSSSPPGFTK...
 WORM ...ENVSDTAIFYSLITQQLLGLVGLGFLIKRVRRELQNTNP.....HIRVFAFSSPPGFTK...
 PLANT ...NQATCAIFYSLITQQLLGLVGLGFLIKRVRRELQKDMF.....HVRVFAFSSPPGFTK...
 FUNGI ...DPTVAIFYSLITQQLLGLVGLGFLIKRVRRELQLNHP.....TLTTFVSSPPGFTK...
 BACTERIA ...ADEATTAIFYSLITQQLLGLVGLGFLIKRVRRELQRDLF.....GLKNFVSSPPGFTK...
 PROTOZOO HDPVEDVDTSKIFYSLITQQLLGLVGLGFLIKRVRRELQARLNGERHCAGLSPITTFVSSPPGFTK...

HUMAN $\alpha 13$ TT
 340 350
 HUMAN LGLNSQT.....KEHGRNELFTDS
 RAT LGLNVQG.....KEYGRNELFTDS
 GOOSE LGLLSSQT.....KELGRNELFTDS
 FROG LGALSSQI.....KESGRTELFTEA
 FISH LGALGQHK.....KEGRATELLEKQ
 WORM LRSLLKCAAP.....SVDVIDE
 PLANT LSKLSSQSRFAEDERGTQSNPS.....STFSEKVLLEPE
 FUNGI LTIIVNGEL.....TGVSNASHPLELL
 BACTERIA LAKARDPAG.....
 PROTOZOO LGEVAKLQQQVEMRSGSISLCSKFAQPRIFGECSEPKAAELFSILRGAVLGLSKHNRGRGCGHFISR

HUMAN $\alpha 14$ $\alpha 15$ $\alpha 16$
 360 370 380 390 400
 HUMAN ECKEISEIT...GDPVHESLKGLLSSG.....EHWQSEKLVRAQTFLHRLCAW
 RAT ECKEIAEVT...GDPVHESLKGLLSSG.....EHWQSEKLVRAQTFLHRLCAW
 GOOSE ERQEISEIT...EDSTTETLKKLLTNS.....EHWQSEKLVRAQTFLHRLCAW
 FROG ECKEIEDIT...GGPLSESLKRLFTSS.....EHWQSEKLVRAQTFLHRLCAW
 FISH EWREVEDVTGAAPGAPALKALRRLLSTST.....EHWQSEKLVRAQTFLHRLCAW
 WORM RLLEICEENEFEGDIRIVELVRLFLLDH.....LNVVNASKYEKIFELIMHLAVR
 PLANT ENHALMTLSDSESSSNGMEVLLNLLEVKH.....CDNATSPRLLPVLEPIHRLCAW
 FUNGI LSEIEIQLEKLPFRSSLESLQMSDST.....RMLDDPQLSRHYCPMIRLCSQ
 BACTERIA LTILESK...RSTALDPVGNFHLNCAIITQLNLLDD.....PNPDEEKSRTELEVRVLIPLAAR
 PROTOZOO LHYHLREGNEDAAANLVTMQYLALAFSGSPEEDGTGSGAPGKADEDVISPWNDSFVTRTVIKPLIRSVAS

HUMAN $\alpha 17$ $\beta 6$ $\alpha 18$ $\beta 7$ $\alpha 19$
 410 420 430 440 450 460 470
 HUMAN YLYGK...RGYALNPFVANFHLNGAVIWRINWMAVSLRGIIGSCGIMUNYRYFLEEFGPNSISYLGSK
 RAT YLYGK...RGYALNPFVANFHLNGAVIWRINWMAVSLRGIIGSCGIMUNYRYFLEEFGPNSISYLGSK
 GOOSE YLYGK...RGYALNPFVANFHLNGAVIWRINWMAVSLRGIIGSCGIMUNYRYFLEEFGPNSISYLGSK
 FROG YLYGK...RGYALNPFVANFHLNGAVIWRINWMAVSLRGIIGSCGIMUNYRYFLEEFGPNSISYLGSK
 FISH YLYGK...RGYALNPFVANFHLNGAVIWRINWMAVSLRGIIGSCGIMUNYRYFLEEFGPNSISYLGSK
 WORM YLYGK...RGYALNPFVANFHLNGAVIWRINWMAVSLRGIIGSCGIMUNYRYFLEEFGPNSISYLGSK
 PLANT YLYGK...RGYALNPFVANFHLNGAVIWRINWMAVSLRGIIGSCGIMUNYRYFLEEFGPNSISYLGSK
 FUNGI YLYGK...RGYALNPFVANFHLNGAVIWRINWMAVSLRGIIGSCGIMUNYRYFLEEFGPNSISYLGSK
 BACTERIA YLYGK...RGYALNPFVANFHLNGAVIWRINWMAVSLRGIIGSCGIMUNYRYFLEEFGPNSISYLGSK
 PROTOZOO YLYGK...RGYALNPFVANFHLNGAVIWRINWMAVSLRGIIGSCGIMUNYRYFLEEFGPNSISYLGSK

HUMAN $\alpha 20$
 480 490
 HUMAN IIRASEQVLSLVAQFQKNSKL.....
 RAT NIKASEQILSLVAQFQKNSKL.....
 GOOSE HIKASEQVLSFVVSQFQNSKL.....
 FROG HIEASDQVLSLVAQFQKNSKL.....
 FISH VIKASEQVLSLVAQFQKNSKL.....
 WORM EAINSDALALL.....
 PLANT RIRASPDHSL.....
 FUNGI IIRASNNFVQPALEWAFSKMRKRHTD.....
 BACTERIA EIRASPAVKSLNQNDDEGRRGGNGQQGSRFAQIMNSTLGGGRK
 PROTOZOO SMPTGDDMLRLNIS.....

Fig.36 Alineamiento de un conjunto de secuencias de malonil-CoA descarboxilasa. Los elementos de estructura secundaria están indicados. Los residuos correspondientes al motivo de union de CoA y las cisteinas que forman los puentes disulfuro en el enzima humano están marcados con * y # respectivamente.

4.8 Caracterización cinética de MCD y variantes mutadas

4.8.1 Ensayos de velocidad inicial con y sin pretratamiento de H₂O₂

Para los ensayos de caracterización cinética de MCD silvestre y las variantes mutadas simples y doble se utilizó un ensayo de actividad acoplado ya descrito (Kim and Kolattukudy, 1978) (Tabla.VIII).

Tanto MCD silvestre como el mutante doble C206S/C243S exhiben cinéticas de saturación típicas Michaelis-Menten (coeficiente de hill, n , próximo a la unidad, Tabla.VIII) con algunas pequeñas variaciones en la constante catalítica k_{cat} (constante catalítica) y $S_{0.5}$ (concentración de sustrato que da 1/2 de la V_{max}), aunque prácticamente con las mismas eficiencias catalíticas ($k_{cat}/S_{0.5}$). Sin embargo, mientras que los parámetros cinéticos se comportan de forma similar para el mutante doble incubado con H₂O₂, la eficiencia catalítica para la variante silvestre del enzima es de casi el doble para una concentración de 0.2 M H₂O₂. De forma más significativa, los datos experimentales fueron ajustados a la ecuación de hill (Ec.1) en la cual el valor de n incrementa gradualmente hasta alcanzar el valor 1.4 a 0.2 M H₂O₂ (Tabla.VIII) (Fig.37).

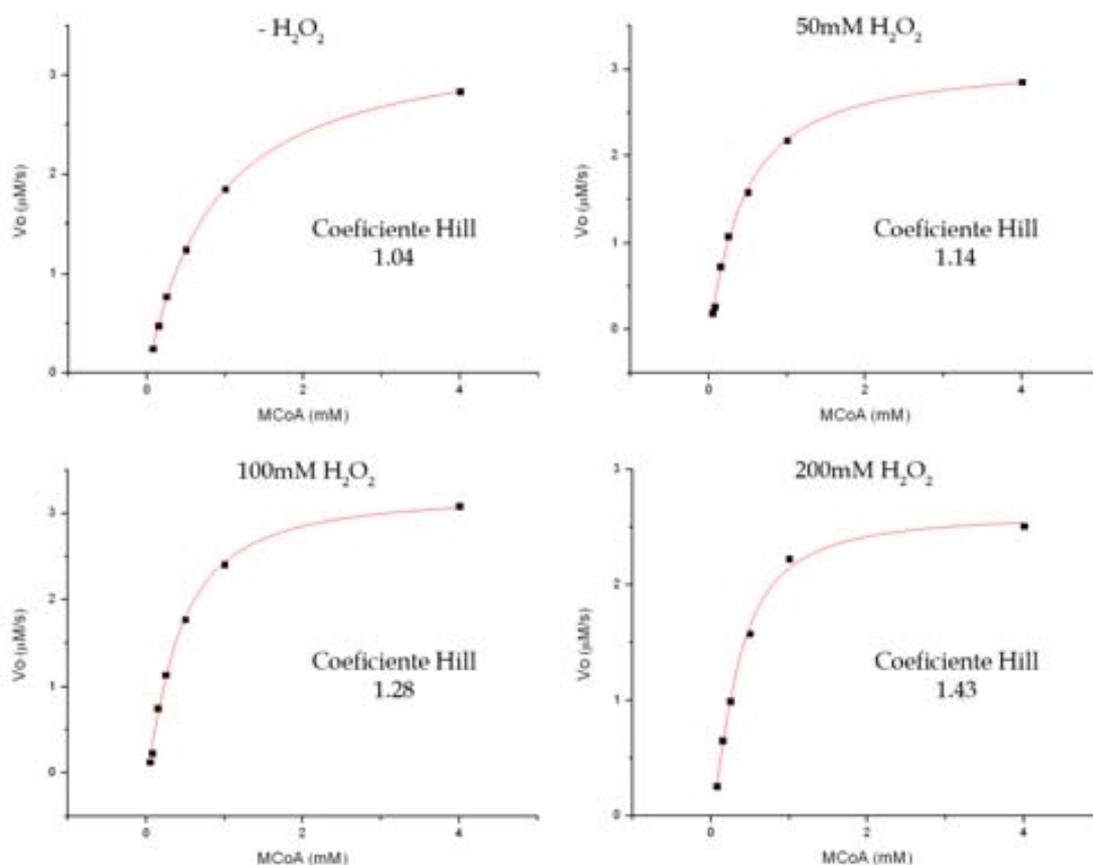


Fig37 Análisis cinético de la actividad de MCD silvestre en presencia de H_2O_2 . Velocidades de descarboxilación de malonil-CoA y coeficientes de Hill ajustadas a la Ec.1. (A) Sin incubación de H_2O_2 , (B), (C) y (D) Incubado en 50mM H_2O_2 , 100mM H_2O_2 y 200mM H_2O_2 respectivamente. El coeficiente de Hill aumenta de 1.04 a 1.43 al pasar de 0 a 200mM H_2O_2 .

En este aspecto, los mutantes simples también exhiben comportamientos diferentes. El mutante C206S tiene un comportamiento más parecido al mutante doble ya que su eficiencia catalítica no varía significativamente con el tratamiento de H_2O_2 y los coeficientes de Hill se mantienen en todos los experimentos cercanos a la unidad. En contraste con la situación anterior, el valor de $(k_{cat}/S_{0.5})$ para el mutante C243S es más del doble y el coeficiente de Hill, n , se eleva hasta 1.37 cuando es incubado con 0.2 M H_2O_2 .

Teniendo en cuenta los diferentes comportamientos observados por la forma silvestre y los mutantes, los resultados sugieren que la formación del puente disulfuro Cys206-Cys206 imparte cooperatividad positiva al comportamiento cinético del enzima.

Tabla.VIII
Parámetros cinéticos de MCD silvestre y las variantes C206S/C243S, C206S, C243S y E302G oxidadas y no oxidadas

MCD Kinetic parameters					
Oxidant (H ₂ O ₂) Concentration (M)	Variant	k_{cat} * (s ⁻¹)	$S_{0.5}$ Malonyl- CoA (mM)	n Hill coefficient	$k_{cat}/S_{0.5}$ (M ⁻¹ s ⁻¹)
0	WT	141.2 ± 2.1	0.83 ± 0.03	1.04 ± 0.02	0.17
0.05	WT	128.3 ± 4.6	0.46 ± 0.04	1.14 ± 0.08	0.28
0.1	WT	135.0 ± 4.2	0.42 ± 0.03	1.28 ± 0.09	0.32
0.2	WT	109.2 ± 3.8	0.35 ± 0.03	1.43 ± 0.12	0.31
0	C206S/C243S	162.5 ± 7.5	1.16 ± 0.13	1.04 ± 0.06	0.14
0.1	C206S/C243S	175.4 ± 9.2	0.99 ± 0.13	1.06 ± 0.07	0.18
0.2	C206S/C243S	167.1 ± 7.1	0.81 ± 0.09	0.98 ± 0.05	0.20
0	C206S	117.1 ± 1.7	0.73 ± 0.02	1.17 ± 0.02	0.16
0.1	C206S	141.2 ± 8.8	1.04 ± 0.16	1.11 ± 0.09	0.14
0.2	C206S	114.2 ± 4.2	0.79 ± 0.08	1.04 ± 0.06	0.15
0	C243S	94.6 ± 2.1	0.58 ± 0.03	1.19 ± 0.05	0.16
0.1	C243S	137.5 ± 5.4	0.68 ± 0.07	1.25 ± 0.09	0.20
0.2	C243S	208.3 ± 2.5	0.56 ± 0.02	1.37 ± 0.04	0.37
0	E302G	13.3 ± 8.8	0.22 ± 0.13	0.43 ± 0.07	0.06

* k_{cat} calculada para monómeros

4.8.2 Implicaciones cinéticas del mutante E302G

El residuo que reemplaza la glicina central en el motivo consenso de GNAT (R/QXXGXG/A) en MCD es el Glu302. Este residuo presenta diferentes disposiciones espaciales dependiendo de si la conformación adoptada es con sustrato, o libre de sustrato. Se investigó la influencia de la cadena lateral del Glu302 en la velocidad de recambio catalítica con el mutante E302G.

Este variante de MCD exhibió una ligera reducción del valor $S_{0.5}$ y una disminución de diez veces el valor de k_{cat} , consistente con una marcada pérdida de eficiencia catalítica (Tabla.VIII)

Sin embargo, podría decirse que el mayor cambio reside en el bajo valor obtenido para el coeficiente de Hill ($n= 0.43$), el cual sugiere cooperatividad negativa en el modo de unión de sustrato cuando la cadena lateral del Glu302 está ausente.

4.8.3 Modelo de catálisis

Los resultados de la superposición del centro activo de MCD sobre el de GNAT han sido reveladores para poder describir el modelo de catálisis para la descarboxilación de malonil-CoA por Malonil-CoA descarboxilasa. Basándonos en los resultados de (Gu et al., 2007) los mutantes de ambos residuos H389A (His423 en MCD) y T355V (Ser329 en MCD) muestran valores de K_{cat} disminuidos 100 veces. Como la Ser329 sirve de anclaje al sustrato, nos lleva a suponer que la His423 en MCD es el candidato ideal para la desprotonación del hidrógeno del carboxílico final de malonil-CoA. (Fig.35).

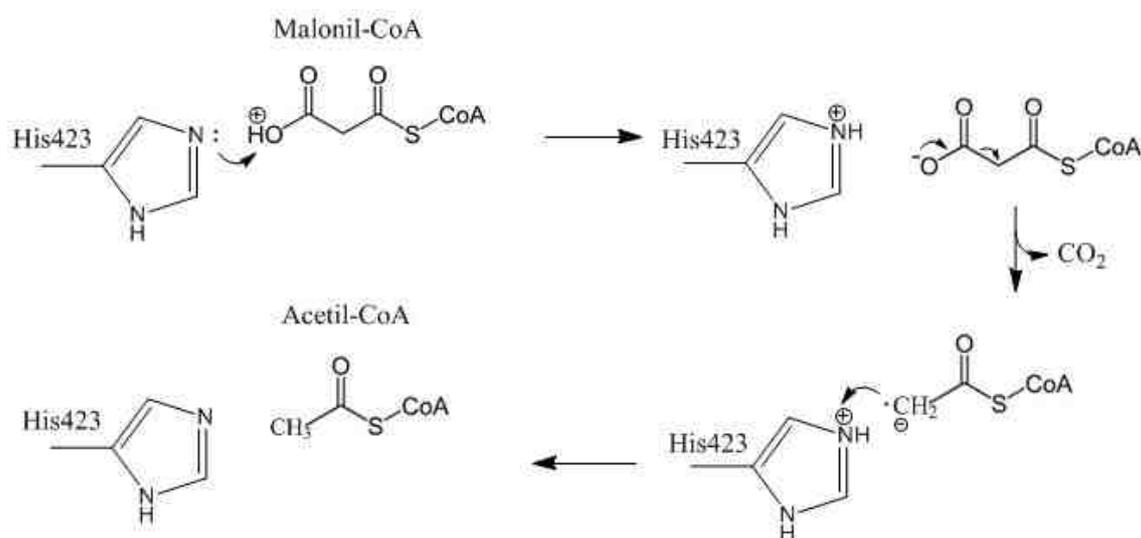


Fig.35 Modelo de mecanismo de catálisis de MCD peroxisomal humana. La His423 parece ser el candidato ideal para la desprotonación del hidrógeno del grupo carboxilato del malonil-CoA.

4.9 Modelo de interacción de MCD con Pex5

4.9.1 Interacción de la parte C-Terminal de MCD con el receptor Pex5

El enzima MCD puede encontrarse en diferentes compartimentos celulares tales como citoplasma, mitocondria y peroxisomas, los cuáles representan distintos ambientes en términos de potenciales redox.

En el transporte de MCD hacia el peroxisoma, es necesaria la interacción con la peroxina 5 (Pex5). Esta interacción se ha investigado superponiendo la secuencia señal PTS1 Ser491-Lys492-Leu493 (SKL) encontrada en una de las subunidades de MCD (Fig.38), al péptido Ser491-Lys492-Leu493 (SKL) del complejo formado con Pex5 (código PDB 1FCH) (Fig.39b).

La conformación extendida mostrada por el tripéptido SKL en ambas estructuras es muy similar, sugiriendo que esta es una conformación estable. Sin embargo, se supone una cierta flexibilidad en la orientación del tripéptido con respecto a la helice α_{20} del C-Terminal de MCD, la cual termina en en residuo Asn490 (Fig.36), ya que el tripéptido no se ha podido localizar en la mayoría de las subunidades de MCD.

Así pues, utilizando el tripéptido SKL como punto de anclaje para la optimización de la orientación de MCD con respecto a Pex5 e intentando evitar los impedimentos estéricos, da como resultado un reducido abanico de opciones posibles.

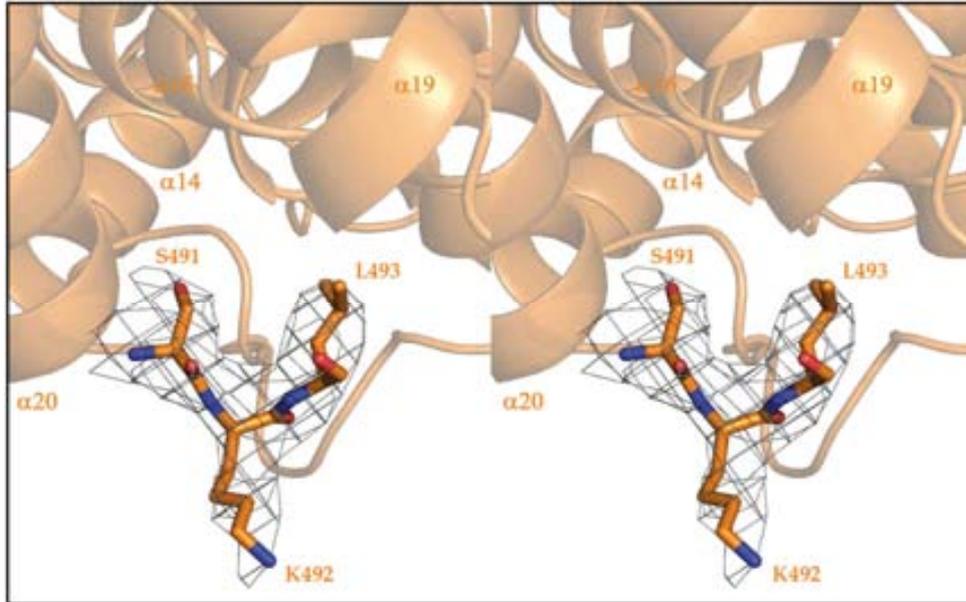


Fig.38 Vistas estereo del mapa de densidad electrónica de 2Fo-FC, a 1 σ , del cristal triclinico correspondiente al motivo de reconocimiento PTS1 Ser⁴⁹¹-Lys⁴⁹²-Leu⁴⁹³ (SKL) observado en C-Terminal de una de las subunidades de MCD. El péptido SKL muestra una conformación extendida de los aminoácidos que forman la secuencia de reconocimiento para Pex5

En todos los casos, la cercanía de las superficies moleculares de MCD y Pex5 sugieren que la interacción específica para el reconocimiento y unión debe incluir regiones que se extienden más allá del motivo SKL. Todas estas supuestas regiones de contacto están localizadas en el núcleo saliente del dominio C-terminal formado por las hélices α 13- α 17 y α 19- α 20 (Fig.28b). Por otro lado, las regiones de interacción para Pex5 no están muy bien definidas por el ensayo de interacción y podrían envolver entre cuatro y seis helices alfa diferentes.

Los resultados obtenidos por el estudio de interacción en el cuál se aprecia que participan regiones específicas diferentes a la secuencia de importación SKL está reforzado con estudios que indican que las proteínas transportadas hacia el peroxisoma a través del sistema PTS1 presentan características estructurales adicionales y diferentes a las mostradas por el tripéptido SKL (Brocard and Hartig, 2006)

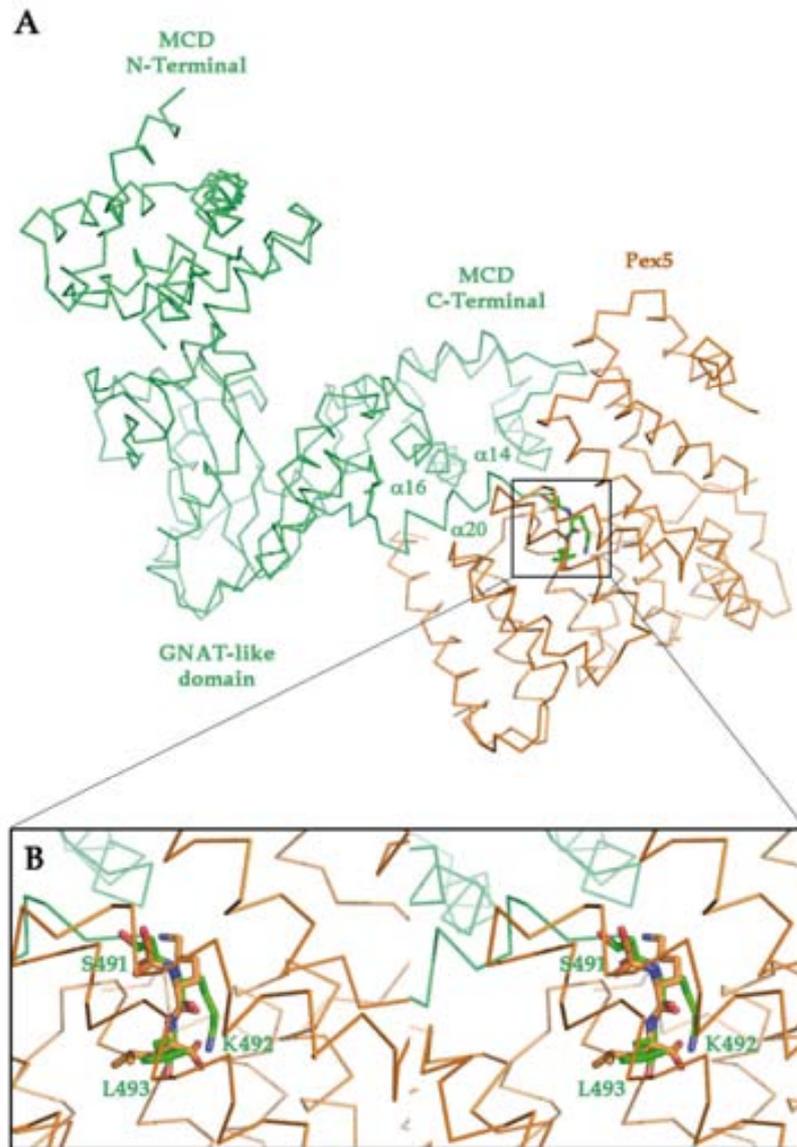


Fig.39 Estudios de interacción entre malonil-CoA descarboxilasa y Peroxina5. (A) Estructura de la interacción de una subunidad de MCD (verde) con Peroxina 5 (marrón). (B) Representación en estéreo de la superposición de la secuencia señal de importación (SKL) determinada en este trabajo en una de las subunidades de MCD y de la encontrada en el complejo entre Peroxina 5 y el tripéptido SKL. Los fuertes contactos entre ambas proteínas parecen sugerir que las interacciones se extienden más allá del tripéptido SKL. En MCD se presume que estos contactos hacen partícipe a algunos residuos del núcleo de helices $\alpha 14$ - $\alpha 16$ y $\alpha 20$ encontrado en el dominio C-Terminal de la proteína.

DISCUSIÓN

5. Discusión

Cada subunidad de MCD contiene un dominio todo-alfa N-Terminal y un dominio catalítico C-Terminal organizado con un plegamiento tipo GNAT. Los miembros de la superfamilia GNAT, con algunos miles de representantes dentro de todos los reinos de seres vivos, normalmente actúan como N-acetil transferasas, transfiriendo grupos acetil a aminas primarias. Habitualmente, los dominios GNATs tienen asignados lugares diferentes para el aceptor y donador del grupo acetil y catalizan la reacción sin ningún tipo de participación de intermediarios del sustrato para el enzima.

La estructura básica del plegamiento tipo GNAT está extraordinariamente conservado, y sirve para desarrollar dos funciones casi universales:

- 1) Unión del grupo panteteína del acetil-CoA
- 2) Polarizar el grupo carbonilo del tioéster a través de interacciones del tipo enlace de hidrógeno.

Estas características generales de las GNATs són aplicables a CurA GNAT (Gu et al., 2007), pero solo la primera se puede aplicar a MCD, porque la polarización del grupo carbonilo del tioéster no es necesaria en la conversión de malonil-CoA a acetil-CoA. Además, ya que la descarboxilación no requiere ningún aceptor del grupo acetil, el lugar de unión para el aceptor en MCD está ausente a diferencia de la mayoría de GNATs.

El tetrámero de MCD se puede describir de una forma más adecuada como la asociación de dos heterodímeros estructurales, cada uno compuesto de dos subunidades con conformaciones alternadas, alojando una el sustrato y otra impidiéndoselo. Esta disposición conformacional es consistente con el mecanismo cinético "half-of-the-sites", en el cuál en un instante dado, sólo una

de las dos cavidades para el sustrato en el heterodímero es activa. Este mecanismo de catálisis es perfectamente compatible con las cinéticas de saturación tipo Michaelis-Menten observadas para MCD silvestre que no ha sido pretratada con agente oxidante.

La ocupancia parcial de la porción panteteína del malonil-CoA muestra que aunque no se han añadido ni el sustrato ni el producto a los cristales de MCD para hacer cocrystalización, una fracción de sustrato/producto se ha arrastrado durante los pasos de purificación, lo que sugiere una unión fuerte y estable. La evidencia de que las dos subunidades del heterodímero estructural presentan dos conformaciones diferentes aún presentando una baja ocupancia de los lugares de unión a sustrato sugiere que la asimetría estructural es intrínseca de MCD e independiente de la presencia de sustrato. Además, todas las estructuras que se han obtenido de MCD presentan la asimetría descrita anteriormente, lo que refuerza la hipótesis de que no se ha generado artefactualmente debido a los contactos cristalinos, y que las diferentes subunidades estructurales están presentes en solución.

El mecanismo “half-of-the-sites” presenta un aparente gasto de energía catalítica, ya que solo la mitad de los centros activos potenciales pueden funcionar a la misma vez. Sin embargo, se ha especulado que los enzimas que catalizan reacciones que provocan pequeños cambios en la estructura del sustrato, tales como la descarboxilación de malonil-CoA a acetyl-CoA, el producto tiene una afinidad similar al sustrato original por el enzima (Fersht, 1975). Así pues, la velocidad de liberación del producto puede interferir en la entrada del siguiente sustrato, provocando que el paso limitante de la velocidad de reacción sea la liberación del producto.

No obstante, el cambio conformacional producido en una subunidad al pasar del estado B (del inglés bound) al estado U (unbound), y que provoca la salida del producto del centro activo, coincide con la formación de un nuevo

lugar de unión en el centro activo de la subunidad vecina al cambiar del estado U a B. De esta manera, los cambios conformacionales sincronizados en la pareja de subunidades facilita la catálisis a pesar de la reducción en el número de centros activos disponibles.

En este sentido, el rol que desarrolla la cadena lateral del Glu302 en los cambios sincronizados en los dos centros activos es evidente. La interacción del carboxilato de la cadena lateral del Glu302 con el grupo hidroxilo de la cadena lateral de la Thr60 del lazo Tyr54-Glu65 de la subunidad adyacente estabiliza la conformación activa B, mientras que en la subunidad con conformación U esta interacción no está formada, permitiendo así la transición B a U y colocando la cadena lateral del Glu302 en la cavidad de unión del sustrato/producto (Fig.32a-b). En la transición de B a U, el Glu302 pasa de una conformación tensa (asociada a Thr60) a una conformación más relajada situada en la zona de unión del grupo panteteína-pirofosfato del malonil-CoA. Produciendo que el lazo Tyr54-Glu65 se desestructura parcialmente.

Así pues, MCD parece utilizar el Glu302 como una especie de palanca molecular, accionando el movimiento desde fuera hacia dentro del centro activo, coordinado con el movimiento del lazo Tyr54-Glu65, facilitando la liberación del producto de reacción en una subunidad y permitiendo la unión de un nuevo sustrato en la otra subunidad después de cada ciclo catalítico. De forma coherente con esta hipótesis, la variante mutada E302G exhibe propiedades catalíticas sustancialmente alteradas, con una afinidad marginalmente superior al sustrato, pero eficiencia catalítica reducida en diez veces y una marcada cooperatividad negativa. La interpretación de este resultado sugiere que al eliminar la cadena lateral del Glu302 en el mutante E302G se produce un enzima en el cual la unión del sustrato en una de las subunidades reduce drásticamente la afinidad de unión para la segunda subunidad, pero no elimina completamente la posibilidad de unir el sustrato en el segundo centro activo como ocurría en el enzima silvestre. Teniendo en

cuenta estos resultados, el mutante Glu302 proporciona una nueva perspectiva en el diseño de nuevos inhibidores para disminuir la actividad de MCD como los diseñados en la actualidad (Dyck et al., 2004; Zhou et al., 2009).

La proximidad y relativa orientación de las parejas de residuos Cys206 y Cys243 a través de las interfases I-IV/II-III y I-II/III-IV del tetrámero, respectivamente, sugieren que, bajo condiciones oxidantes, las cuatro subunidades del tetrámero molecular están conectadas a través de puentes disulfuro. Esta hipótesis está confirmada por la existencia de los tetrámeros obtenidos en geles en condiciones no desnaturizantes (Fig.32a) y en la estructura de MCD mitocondrial donde los enlaces disulfuro están parcialmente formados.

Además, los parámetros cinéticos de MCD también se ven afectados por la formación de los puentes disulfuro, mostrando un incremento aparente en la cooperatividad positiva (coeficientes de Hill más elevados de 1) relacionado con el aumento del agente oxidante. Como la estructura cristalina mostró que la unión simultánea de los sustratos a las dos subunidades del heterodímero no está permitido, la interpretación más obvia de estos coeficientes de Hill es que, cuando los puentes disulfuro están formados, la unión del sustrato a una subunidad eleva la afinidad de la subunidad del tetrámero relacionada por un eje binario molecular. Es interesante observar que las subunidades relacionadas por la cooperatividad no presenta ninguna interacción en la estructura de MCD, y por lo tanto los cambios inducidos por unión/liberación del sustrato se transmiten a través de las demás subunidades del tetrámero. La evidencia de que solo se ha observado cooperatividad positiva en el enzima silvestre y la variante mutada C243S, y no en los mutantes C206S y C206S/C243S, sugiere que el enlace disulfuro Cys206-Cys206 entre las interfases I-IV y II-III es el más importante de todos los enlaces disulfuro posibles para impartir el efecto de cooperatividad.

A pesar del éxito obtenido intentando demostrar la cooperatividad positiva utilizando peróxido de hidrógeno, la oxidación inespecífica aparente del H_2O_2 ha dejado abiertas algunas preguntas. Por ejemplo, no se entiende el porque de la oxidación cooperativa para la formación del tetrámero con preferencia al dímero y porque los dímeros de las variantes individuales mutadas C206S y C243S no se forman. Asimismo, aún con la preferencia mostrada por la formación de tetrámeros unidos por puente disulfuro, no hay una conversión cuantitativa total hacia el tetrámero, incluso a concentraciones elevadas de H_2O_2 (1.6M) (Fig.32a), posiblemente como resultado de la oxidación del grupo sulfhidrilo a derivados sulfinicos y/o sulfónicos. La formación parcial del tetrámero es consistente con la formación parcial de los puentes disulfuro en la estructura de mMCD y sugiere que el valor obtenido para el coeficiente de Hill (n) de 1.4 determinado posteriormente a la incubación con 0.2 M H_2O_2 , podría estar por debajo del valor real. El significado in vivo que se le puede atribuir al efecto de cooperatividad inducido por los puentes disulfuro, que de esta forma modularían el comportamiento de MCD en los compartimentos celulares con diferentes ambientes redox, no está del todo elucidado, así como tampoco lo está si el mecanismo real in vivo de regulación de MCD es la oxidación y reducción del enzima.

Malonil-CoA descarboxilasa es un enzima muy importante en el metabolismo de los ácidos grasos. La estructura de MCD humana peroxisomal muestra un tetrámero descrito mejor como un dímero de heterodímeros estructurales, en el cual las subunidades adoptan diferentes conformaciones. El complejo mecanismo regulador presentado por la actuación de la reactividad por half-of-the-sites y la cooperatividad positiva entre las subunidades de los heterodímeros es consistente para un enzima que ha de modular la concentración de un metabolito tan importante como el malonil-CoA presente en los diferentes compartimentos celulares con ambientes redox variados. Por ejemplo, en general se cree que los peroxisomas tienen un ambiente reductor originado principalmente por la actividad de la catalasa (Schrader and Fahimi,

2006; Willekens et al., 1997), sin embargo la proximidad de los grupos tioles de las proteínas mitocondriales con las especies reactivas producidas por la cadena de transporte electrónico hacen del ambiente mitocondrial un lugar más oxidante para las proteínas que el del citosol o peroxisoma (Lin et al., 2002).

CONCLUSIONES

6. Conclusiones

1. Se ha determinado la estructura tridimensional de Malonil-CoA Descarboxilasa (MCD) obteniendo las fases del cristal hexagonal $P6_122$ mediante el método SAD y extendiendo fases hasta 3.29\AA utilizando el cristal triclínico $P1$
2. Cada monómero de MCD presenta un dominio N-Terminal todo hélice alfa y un dominio C-Terminal catalítico exhibiendo un plegamiento típico de la familia de las GCN5-Histona N-acetiltransferasas (GNAT)
3. La formación del tetrámero está compuesto por un dímero de heterodímeros relacionados por un eje de simetría binario. La fuerte asimetría estructural entre los monómeros del heterodímero sugiere un mecanismo de reacción half-of-the-sites en el cuál solo la mitad de los centros activos son funcionales al mismo tiempo.
4. El centro activo ha sido caracterizado mediante modelaje con la estructura homóloga de CurA GNAT. Descifrando los residuos His423 y Thr329 en MCD como de vital importancia para la unión y catálisis del malonil-CoA.
5. Cada heterodímero contiene dos conformaciones estructuralmente diferentes, la conformación B, en la que el sustrato está unido, y la conformación U, donde la unión del sustrato no está permitida por problemas estéricos. La liberación del producto de la reacción produce un cambio conformacional que permite la entrada del sustrato en la subunidad adyacente formada en el heterodímero. Este cambio conformacional se transmite a todas las subunidades mediante las interfases de interacción.

6. El mutante E302G presenta una eficiencia catalítica disminuida 100 veces respecto a MCD silvestre, que unido a las diferencias estructurales observadas en los monómeros que forman el heterodímero, sugieren que actúa como palanca accionadora de la liberación del sustrato en la conformación B, mientras que en la conformación U impide la unión del sustrato al centro activo.
7. Los ensayos de actividad de MCD silvestre muestran un comportamiento típico Michaelis-Menten consistente con el mecanismo de cooperación negativa total “half-of-the-sites” entre subunidades del heterodímero.
8. La incubación de MCD silvestre con peróxido de hidrógeno resulta en un incremento en el coeficiente de Hill y un aumento de la eficiencia catalítica a medida que aumenta la concentración de peróxido de hidrógeno.
9. Los coeficientes de Hill mostrados por los mutantes C243S y C206S en presencia de peróxido de hidrógeno indican que la cooperatividad impartida entre heterodímeros proviene mayoritariamente del enlace disulfuro Cys206-Cys206.
10. Las pruebas de “docking” sugieren que el dominio C-terminal de MCD podría estar implicado, además de la secuencia de interacción SKL en el reconocimiento y unión a Pex5

ANEXO

7. Anexo

Durante la realización de esta tesis en el grupo del Prof. Ignacio Fita en colaboración con el laboratorio del Prof. Peter C. Loewen , se ha publicado un artículo en el cuál aparezco como primer autor en Acta Cryst Section F:

“Structure of glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPD1) from *Saccharomyces cerevisiae* at 2.45 resolution”

David Aparicio, Munmun Nandi, Xavi Carpena, Ignacio Fita and Peter C. Loewen

Además, hay otro artículo en proceso de revisión en la revista Journal of Biological Chemistry en el que también aparezco como primer autor:

“Structural asymmetry and disulfide bounds among subunits modulates the activity of human Malonyl-CoA Decarboxylase”

David Aparicio, Rosa Pérez, Xavier Carpena, Mireia Díaz, Joan C. Ferrer, Peter C. Loewen and Ignacio Fita



Acta Crystallographica Section F

**Structural Biology
and Crystallization
Communications**

ISSN 1744-3091

Editors: H. M. Einspahr and M. S. Weiss

Structure of glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPD1) from *Saccharomyces cerevisiae* at 2.45 Å resolution

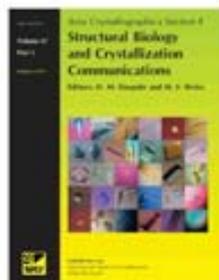
David Aparicio Alarcon, Munmun Nandi, Xavi Carpena, Ignacio Fita and
Peter C. Loewen

Acta Cryst. (2012). **F68**, 1279–1283

Copyright © International Union of Crystallography

Author(s) of this paper may load this reprint on their own web site or institutional repository provided that this cover page is retained. Republication of this article or its storage in electronic databases other than as specified above is not permitted without prior permission in writing from the IUCr.

For further information see <http://journals.iucr.org/services/authorrights.html>

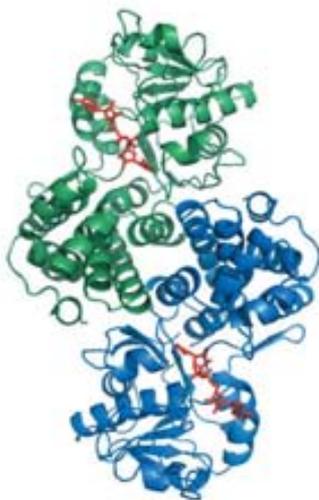


Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications is a rapid all-electronic journal, which provides a home for short communications on the crystallization and structure of biological macromolecules. Structures determined through structural genomics initiatives or from iterative studies such as those used in the pharmaceutical industry are particularly welcomed. Articles are available online when ready, making publication as fast as possible, and include unlimited free colour illustrations, movies and other enhancements. The editorial process is completely electronic with respect to deposition, submission, refereeing and publication.

Crystallography Journals **Online** is available from journals.iucr.org

David Aparicio Alarcon,^a
Munmun Nandi,^b Xavi Carpena,^a
Ignacio Fita^a and Peter C.
Loewen^{b*}^aInstitute for Research in Biomedicine (IRB
Barcelona) and Institut de Biologia Molecular de
Barcelona (IBMB–CSIC), Parc Científic, Baldiri
Reixac 10, 08028 Barcelona, Spain, and^bDepartment of Microbiology, University of
Manitoba, Winnipeg, MB R3T 2N2, CanadaCorrespondence e-mail:
ploewen@ad.umanitoba.caReceived 11 June 2012
Accepted 3 September 2012

PDB Reference: GPD1, 4fgw

© 2012 International Union of Crystallography
All rights reserved

Structure of glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPD1) from *Saccharomyces cerevisiae* at 2.45 Å resolution

The interconversion of glycerol 3-phosphate and dihydroxyacetone phosphate by glycerol-3-phosphate dehydrogenases provides a link between carbohydrate and lipid metabolism and provides *Saccharomyces cerevisiae* with protection against osmotic and anoxic stress. The first structure of a glycerol-3-phosphate dehydrogenase from *S. cerevisiae*, GPD1, is reported at 2.45 Å resolution. The asymmetric unit contains two monomers, each of which is organized with N- and C-terminal domains. The N-terminal domain contains a classic Rossmann fold with the (β - α - β - α - β)₂ motif typical of many NAD⁺-dependent enzymes, while the C-terminal domain is mainly α -helical. Structural and phylogenetic comparisons reveal four main structure types among the five families of glycerol-3-phosphate and glycerol-1-phosphate dehydrogenases and reveal that the *Clostridium acetobutylicum* protein with PDB code 3ce9 is a glycerol-1-phosphate dehydrogenase.

1. Introduction

The interconversion of glycerol and dihydroxyacetone, either phosphorylated or unphosphorylated, is a key step in the integration of carbohydrate and lipid metabolism and in glycerol metabolism (Linn, 1976). The importance of this metabolic transition is evident from the evolution of at least five phylogenetically unrelated or distantly related families of enzymes that catalyze this reaction. The family with the widest metabolic impact includes the glycerol-3-phosphate dehydrogenases (G3PDHs), which are at the core of carbohydrate and lipid catabolism and anabolism. Glycerol 3-phosphate from the breakdown of phospholipids and triglycerides (*via* glycerol kinase) is converted into the glycolysis intermediate dihydroxyacetone phosphate, while the reverse reaction produces glycerol 3-phosphate, which is required for the synthesis of triglycerides and phospholipids (Fig. 1). In addition, the concerted action of cytosolic (NAD⁺-dependent) G3PDHs and membrane-bound (FAD-dependent) G3PDHs transfers reducing equivalents from cytosolic NADH into the electron-transport chain of both bacteria and mitochondria (Fig. 1; Larsson *et al.*, 1998; Shen *et al.*, 2003). The yeast cytosolic G3PDHs GPD1 and GPD2 can functionally complement one another but are differentially regulated, with GPD1 responding to osmotic stress for elevated glycerol production and GPD2 responding to anoxic conditions, presumably to convert excess NADH to NAD⁺ (Ansell *et al.*, 1997). In addition, the reduction of dihydroxyacetone phosphate by G3PDH prevents its conversion into the potentially toxic methylglyoxalate (Richard, 1984; Lo *et al.*, 1994; Martins *et al.*, 2001).

Glycerolipids are most commonly based on glycerol 3-phosphate, but some species, particularly among the archaeobacteria, utilize the enantiomeric glycerol 1-phosphate. Consequently, G3PDHs are supplemented in some organisms with NAD(P)⁺-dependent glycerol-1-phosphate dehydrogenases (G1PDHs; Koga *et al.*, 1998; Nishihara & Koga, 1995), which surprisingly show lower sequence similarity to G3PDHs than to bacterial and eukaryotic glycerol dehydrogenases (GDHs). The GDHs are primarily responsible for the oxidation of glycerol to dihydroxyacetone, which must be phosphorylated before entering the glycolytic pathway, making them less versatile metabolically than the G3PDHs (Linn, 1976). Examples of this enzyme

Table 1
Data-collection and refinement statistics.

Values in parentheses are for the highest resolution shell.

Data-collection statistics	
Space group	$P4_1$
Unit-cell parameters	
a (Å)	64.43
b (Å)	64.43
c (Å)	198.05
$\alpha = \beta = \gamma$ (°)	90.0
Resolution (Å)	29.42–2.45 (2.51–2.45)
Unique reflections	29349 (2152)
Completeness (%)	99.8 (99.9)
R_{merge}	0.075 (0.510)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	16.7 (3.0)
Multiplicity	4.2 (4.2)
Model-refinement statistics	
No. of reflections	29349
R_{free} (%)	20.0
R_{work} (%)	20.8
Non-H atoms	5132
Water molecules	68
Average B factor (Å ²)	65.8
Coordinate error† (Å)	0.47
R.m.s.d. bonds (Å)	0.008
R.m.s.d. angles (°)	1.19

† Based on maximum likelihood.

can be found among the broad-substrate-range polyol dehydrogenases (Ruzhenikov *et al.*, 2001) and the aldo-keto reductases (Richter *et al.*, 2010).

Structures are available for at least one member of each of these families of G(P)DHs except the G1PDHs. For example, the G3PDHs from *Archaeoglobus fulgidis* (PDB entry 1txg; Sakasegawa *et al.*, 2004), *Thermotoga maritima* (PDB entry 1z82; Lesley *et al.*, 2002), *Coxiella burnetii* (PDB entry 3k96; Center for Structural Genomics of Infectious Diseases, unpublished work), *Plasmodium falciparum* (PDB entry 1yj8; Structural Genomics of Pathogenic Protozoa Consortium, unpublished work), *Leishmania mexicana* (PDB entry 1n1e; Choe *et al.*, 2003) and *Homo sapiens* (PDB entry 1x0v; Ou *et al.*, 2006) are NAD⁺-dependent and cytosolic, while the enzymes from *Escherichia coli* (PDB entry 2qcu; Yeh *et al.*, 2008) and *Bacillus halodurans* (PDB entry 3da1; Northeast Structural Genomics

Consortium, unpublished work) are FAD-dependent and membrane-associated. The NAD⁺-dependent GDHs from *B. stearothermophilus* (PDB entry 1jpu; Ruzhenikov *et al.*, 2001), *Sinorhizobium meliloti* (PDB entry 3uhj; New York Structural Genomics Research Consortium, unpublished work), *Clostridium acetobutylicum* (PDB entry 3ce9; Joint Center for Structural Genomics, unpublished work), *Schizosaccharomyces pombe* (PDB entry 1ta9; A. M. Mulichak, unpublished work) and *T. maritima* (PDB entry 1kq3; Lesley *et al.*, 2002) are members of the diverse group of polyol dehydrogenases, while the NADP⁺-dependent GDH from *Gluconobacter oxydans* (PDB entry 3n2t; Richter *et al.*, 2010) is a member of the aldo-keto reductase family. To date, the structure of a G1PDH has not been reported.

In light of the physiological information pertaining to the G3PDHs from *Saccharomyces cerevisiae*, the absence of a structure of a representative enzyme from this species is notable. To fill this void, we report here the structure of GPD1 from *S. cerevisiae* refined to 2.45 Å resolution and compare the structures and phylogenetic groupings of the GPDH and GDH families, which reveals that a G1PDH structure has been reported but incorrectly annotated.

2. Materials and methods

2.1. Expression and purification of GPD1

The clone for GPD1, YDL022W (Gelperin *et al.*, 2005), was purchased from Open Biosystems. The open reading frame was amplified using the primers 5'-AGCAGAATTCATATGTCTGCTGCTGC (forward) and 5'-AAGAAGGATCCTTAATCTTCATGTAG (reverse) and transferred into pKS+ for sequence confirmation and then into pET28b using the restriction enzymes *Bam*HI and *Nde*I to generate pET28b-GPD1. Expression in *E. coli* BL21 was induced with 0.1 mM IPTG and the cells were incubated at 310 K for 16 h. The cells were lysed using a French press and the crude extract was fractionated with ammonium sulfate followed by ion-exchange chromatography on DEAE cellulose. The purified protein was judged to be >95% pure by SDS-PAGE, with a specific activity of 0.03 μmol dihydroxyacetone phosphate reduced per minute per milligram of protein at room temperature, which is slightly lower than the specific activity of the enzyme from chicken liver (White & Kaplan, 1969).

2.2. Crystallization and refinement of GPD1

GPD1 was crystallized by the hanging-drop vapour-diffusion method using a reservoir solution consisting of 12% polyethylene glycol 8000, 0.1 M Tris-HCl pH 8.5, 0.3 M MgCl₂. The first crystals appeared on the second day and continued growing to dimensions of 150 × 30 μm. Crystals flash-cooled using 20% glycerol as a cryoprotectant were used for data collection to 2.45 Å resolution on the ID29 beamline at the ESRF, Grenoble (Table 1). Data were processed with the *XDS* package (Kabsch, 2010) and a molecular-replacement solution was found with *Phaser* (McCoy *et al.*, 2007) using the N-terminal and C-terminal domains of a monomer of the human enzyme (PDB entry 1x0v; sequence identity of 45.6%) as the search model. The protein structure was refined using *REFMAC* (Murshudov *et al.*, 2011) and manually modelled with the molecular-graphics program *Coot* (Emsley & Cowtan, 2004). A final refinement cycle with *BUSTER* (Bricogne *et al.*, 2011) produced R and R_{free} values of 20.0% and 20.8%, respectively (Table 1). The coordinates have been deposited in the PDB as entry 4fgw.

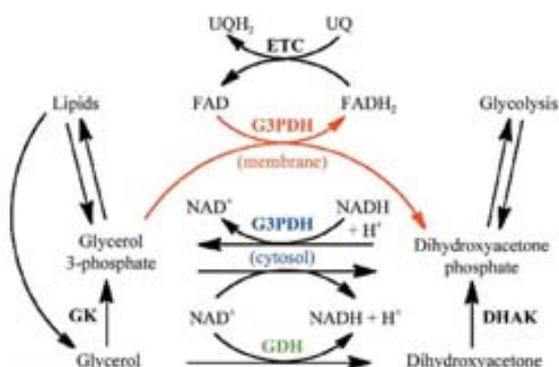


Figure 1
Schematic outline of the roles of G3PDH and GDH in metabolism. The cytosolic G3PDH (blue) interconverts glycerol 3-phosphate and dihydroxyacetone phosphate depending on the catabolic/anabolic state of the cell. The membrane-bound G3PDH (red) preferentially oxidizes glycerol 3-phosphate and transfers the electrons to ubiquinone in the respiratory electron-transport chain for ATP production. GDHs (green) preferentially oxidize glycerol to dihydroxyacetone. Both glycerol and dihydroxyacetone can be phosphorylated at the expense of ATP by glycerol kinase (GK) and dihydroxyacetone kinase (DHAK), respectively.

Table 2
Glycerol (phosphate) dehydrogenase sequences used for phylogenetic analysis in Fig. 4.

No.	Strain	GenBank No.	PDB code
1	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>		1tsg
2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CAA08827.1	4fgw
3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CAA62526.1	
4	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	CAA91259.1	
5	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	CAA39630.1	
6	<i>Homo sapiens</i>		1x0v
7	<i>Plasmodium falciparum</i>		1yjh
8	<i>Bacillus halodurans</i> C-125	NP_242506.1	
9	<i>Coriella burnetii</i>		3k96
10	<i>Thermotoga maritima</i>		1z82
11	<i>Leishmania mexicana</i>		1nlg
12	<i>Stigella</i> sp. D9	ZP_08394385.1	
13	<i>Escherichia coli</i> IAB1	YP_002368887.1	2qcu
14	<i>Klebsiella oxytoca</i> KCTC 1086	YP_005016918.1	
15	<i>Bacillus megaterium</i> DSM 319	YP_003595771.1	
16	<i>Planococcus donghaiensis</i>	ZP_08095479.1	
17	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> RO-NN-1	YP_005556002.1	
18	<i>Bacillus halodurans</i>		3da1
19	<i>Homo sapiens</i>	AAB60403.1	
20	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CAA86123.1	
21	<i>Parasolenomon aeruginosa</i> PA7	YP_001349596.1	
22	<i>Glaucobacter moribifer</i> G707	ZP_09092611.1	
23	<i>Glaucobacter oxydans</i>		3n2t
24	<i>Commensalibacter intestini</i> A911	ZP_09012598.1	
25	<i>Acetobacter tropicalis</i> NBRC 101654	ZP_08643811.1	
26	<i>Streptococcus mutans</i> UA159	AAN58240.1	
27	<i>Bacillus stearothermophilus</i>		1jpu
28	<i>Thermotoga maritima</i> MSB8	EHA59067.1	
29	<i>Enterococcus faecalis</i> TX1467	EGG53141.1	
30	<i>Sinorhizobium meliloti</i>		3uhj
31	<i>Escherichia coli</i> MS 107-1	ZP_07099561.1	
32	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	O13702.1	1ta9
33	<i>Methanosaeta concilis</i> GP6	YP_004383617.1	
34	<i>Methanococcus burtonii</i> DSM 6242	ABE51967.1	
35	<i>Thermoplasma azoonium</i> 768-20	AEA13476.1	
36	<i>Acetobacterium woodii</i> DSM 1030	AFA47572.1	
37	<i>Eubacterium limosum</i> KIST812	ADO36353.1	
38	<i>Thermotomarchaeobacterium cyclanolyticum</i> LX-11	YP_004470282.1	
39	<i>Mahella australiensis</i> 50-1 B0N	YP_004462215.1	
40	<i>Paenibacillus polymyxa</i> M1	CCC84600.1	
41	<i>Clostridium acetobutylicum</i>		3ce9
42	<i>Anaplasma centrale</i> str. Israel	YP_003328243.1	

2.3. Phylogenetic analysis

The sequences listed in Table 2 were aligned using *ClustalW* and phylogenetic inferences were determined using programs from the *PHYLIP* 3.69 package (Felsenstein, 1989), including *SEQBOOT*, *PROTDIST*, *FITCH* and *CONSENSE*. The quality of the branching patterns was assessed by bootstrap resampling of the data sets using 100 replications.

3. Results and discussion

3.1. Cloning, expression and crystallization of GPD1

A clone of *S. cerevisiae* YDL022W encoding GPD1 was purchased from Open Biosystems and transferred into pKS+ and pET28b for sequence verification and expression, respectively. The purified protein was crystallized and its structure was determined at 2.45 Å resolution (Table 1). The homodimeric structure of the enzyme is reflected by the presence of two subunits in the asymmetric unit related by an exact noncrystallographic twofold axis (Fig. 2). The electron-density maps defined a nearly continuous backbone from residue 35 to the C-terminal residue 385 in both subunits. However, in one of the subunits electron density was poor for the protein region from Glu74 to Gln91, which was likely to be a result of conformational variability as suggested by the relatively high temperature-

factor values, which nevertheless did not affect the overall quality of the refined model (Table 1).

The structure determined corresponds to the apoenzyme and is very similar to those of other cytosolic G3PDHs with the subunits organized in two domains. The N-terminal domain contains a classic Rossmann fold (β - α - β - α - β)₂ (Rao & Rossmann, 1973) with parallel β -strands common to NAD-binding proteins and is extended by an (α - β - α - β) motif but with the two additional β -strands oriented antiparallel to the first six. The C-terminal domain consisting of residues 236–385 is largely α -helical. The crevasse formed in the waist of the subunit between the two domains harbours the NAD⁺-binding site along the Rossmann fold (Fig. 2). The human and yeast enzymes differ primarily in two extended loops in the human enzyme that protrude into the binding pocket, making it somewhat smaller.

3.2. Comparison with other glycerol dehydrogenase structures

GPD1 superimposes well onto the structures of the six cytosolic enzymes (PDB entries 1nlg, 1tsg, 1x0v, 1yjh, 1z82 and 3k96) with root-mean-square deviations of 1.8–2.7 Å for 290–330 C^α atoms. However, attempts to superimpose GPD1 onto either of the two membrane-bound G3PDHs or any of the six GDHs revealed three distinct groupings of substantially different structures that precluded superimposition (Fig. 3). The membrane-bound G3PDHs from *E. coli* (PDB entry 2qcu) and *B. halodurans* (PDB entry 3da1) contain three (β - α - β) motifs in the N-terminal 170 residues that are not organized in a classic Rossmann fold and the remainder of the protein is rich in β -sheets, mainly with an antiparallel organization (Fig. 3b). The GDH from *G. oxydans* (PDB entry 3n2t) shares the repeating (α - β)_n motif common to the aldo-keto reductase family that is organized with the β -strands forming a central barrel surrounded by the helical segments (Fig. 3c). Lastly, the GDHs from *B. stearothermophilus* (PDB entry 1jpu), *Sinorhizobium meliloti* (PDB entry 3uhj), *Schizosaccharomyces pombe* (PDB entry 1ta9), *Thermotoga maritima* (PDB entry

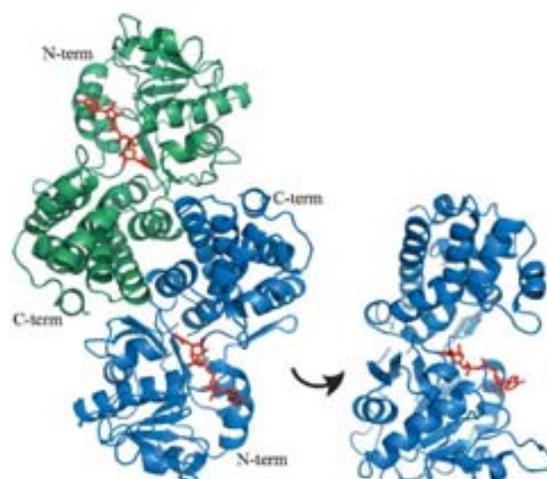


Figure 2
Structure of *S. cerevisiae* GPD1. Left: the dimer found in the asymmetric unit and the biologically active form of the enzyme. The A subunit is shown in blue and the B subunit is shown in green. The N-terminal domain (N-term) and C-terminal domain (C-term) are labelled. NAD⁺ molecules are coloured red and their locations are deduced from the binding site in the human enzyme (PDB entry 1x0v). Right: the A subunit rotated by 90° to provide a better view of the substrate-binding cleft.

structural communications

1kq3) and *Clostridium acetobutylicum* (PDB entry 3ce9; but see below) contain a modified Rossmann fold with the first (β - α - β - α - β) motif (residues 11–67) followed by an (α - β - α - β) motif (residues 70–118) (Fig. 3*d*).

3.3. PDB entry 3ce9 is a glycerol-1-phosphate dehydrogenase structure

In an attempt to gain insight into how the family of G1PDHs may be related to these different structural groups, representative sequences from each family were aligned and subjected to phylogenetic analysis (Fig. 4). The resulting tree contains the expected five groups or clades: the cytosolic G3PDHs (clade A in Fig. 4), the membrane-bound G3PDHs (clade B), the aldo-keto reductase-like

GDHs (clade C), the polyol dehydrogenase-like GDHs (clade D) and the G1PDHs (clade E). The surprise in this analysis is the location of the supposed GDH of *C. acetobutylicum* (protein 41 in Fig. 4) among the G1PDH-family sequences, suggesting that the protein with PDB code 3ce9 should be re-annotated as a G1PDH. Serendipitously, this outcome fills the hole created by the lack of a G1PDH structure; there is in fact at least one representative structure from each of the five clades of glycerol (phosphate) dehydrogenases. The close relationship between the polyol dehydrogenase-like GDHs and the G1PDHs on the same branch of the tree in Fig. 4 is further substantiated by the structure 3ce9 being very similar to the structure 1jpu in Fig. 3(*d*). *C. acetobutylicum* G1PDH shares 21% sequence similarity with *B. stearothermophilus* GDH and the root-mean-square deviation (r.m.s.d.) on 295 C α atoms after superimposition is 2.6 Å.

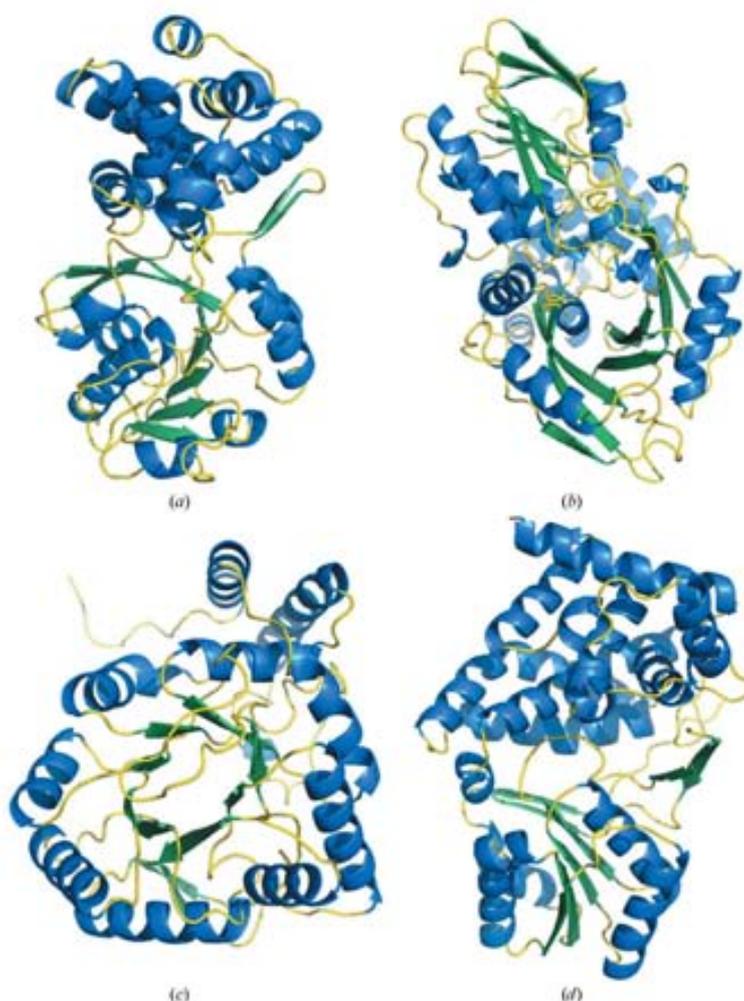


Figure 3

Comparison of monomer structures of representatives of each of the five families of glycerol (phosphate) dehydrogenases. (*a*) *S. cerevisiae* GPD1 (PDB entry 4fgw) represents the cytosolic G3PDHs. (*b*) *E. coli* GlpD (PDB entry 2gcu) represents the membrane-bound G3PDHs. (*c*) *G. oxydans* AKR11B4 (PDB entry 3n2t) represents GDHs resembling aldo-keto reductases. (*d*) *B. stearothermophilus* GDH (PDB entry 1jpu) represents GDHs from the polyol dehydrogenase family and also the G1PDHs. The classic Rossmann fold is positioned at the bottom in (*a*). The high β -sheet content in GlpD is evident at the top and bottom of (*b*). Modified Rossmann folds are evident in the core of AKR11B4 in (*c*) and at the bottom of GDH in (*d*).

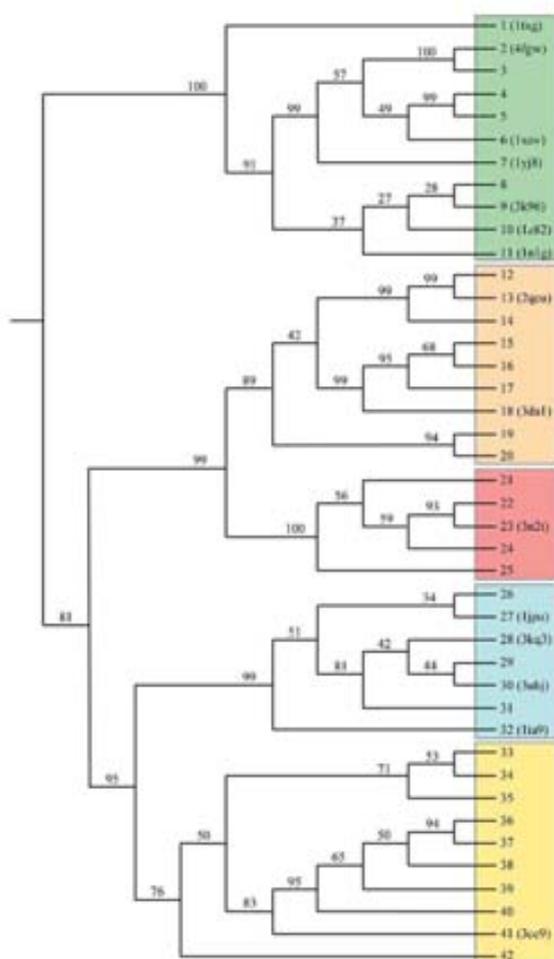


Figure 4
Phylogenetic analysis of the glycerol (phosphate) dehydrogenase family. The tree was constructed using *FITCH* from the 42 protein sequences listed in Table 2 aligned using *ClustalW*. The percentage of replicates in the bootstrap resampling that contain the branch shown are indicated and PDB codes are included for those proteins for which structures have been reported. Group A contains the cytosolic G3PDHs (structures in Fig. 3*a*), group B contains the membrane-bound G3PDHs (Fig. 3*b*), group C contains the aldo-keto reductase-like proteins (Fig. 3*c*), group D contains the polyol dehydrogenase-like GDHs (Fig. 3*d*) and group E contains the G1PDHs. It should be noted that protein 41, which was annotated in PDB entry 3ce9 as being a GDH and has a structure very similar to that of *B. stevensonii* GDH (PDB entry 1jpu) in Fig. 3*d*), clearly groups with the G1PDHs.

This can be compared with the greater similarity among the four GDHs, with 45–50% sequence similarity and r.m.s.d. values of 1.0–1.2 Å on 330–350 C α atoms for superimposition of 1jpu on 3kq3, 1ta9 and 3uhj.

4. Conclusions

The structure of *S. cerevisiae* GPD1 has been refined to 2.45 Å resolution. Each monomer is organized with distinct N-terminal and

C-terminal domains, with the N-terminal domain containing a classic Rossmann-fold (β - α - β - α - β)₂ motif. The β -sheet element is extended by an additional (α - β - α - β) motif, albeit with the added two β -strands oriented antiparallel to the strands in the main fold. The structure of GPD1 is very similar to those of other cytosolic G3PDHs, but differs substantially from the eight other reported G3PDH and GDH structures. Phylogenetic analysis of glycerol (phosphate) dehydrogenase proteins confirmed the existence of five families or clades and revealed that one protein previously annotated as a GDH with its structure reported as PDB entry 3ce9 was actually a G1PDH. Thus, there is one representative structure for each of the five families and the close relationship between GDHs and G1PDHs is clearly evident from the structures of the polyol dehydrogenase-like GDHs being very similar to the G1PDH structure.

This work was supported by a Discovery Grant 9600 from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, by the Canada Research Chair Program (to PCL) and by grant BFU2009-09268 from the Ministerio de Educación y Ciencia (MEC), Spain (to IF).

References

- Ansell, R., Granath, K., Hohmann, S., Thevelein, J. M. & Adler, L. (1997). *EMBO J.* **16**, 2179–2187.
- Bricogne, G., Blanc, E., Brandl, M., Flemsburg, C., Keller, P., Paciorek, W., Roversi, P., Sharff, A., Smart, O. S., Vornheim, C. & Womack, T. O. (2011). *BUSTER*. Cambridge: Global Phasing Ltd.
- Choe, J., Guerra, D., Michels, P. A. M. & Hol, W. G. J. (2003). *J. Mol. Biol.* **329**, 335–349.
- Emsley, P. & Cowtan, K. (2004). *Acta Cryst. D* **60**, 2126–2132.
- Felsenstein, J. (1989). *Clustal*, 5, 164–166.
- Gelperin, D. M., White, M. A., Wilkinson, M. L., Kon, Y., Kung, L. A., Wise, K. J., Lopez-Hoyo, N., Jiang, L., Piccirillo, S., Yu, H., Gerstein, M., Dumont, M. E., Phizicky, E. M., Snyder, M. & Grayhack, E. J. (2005). *Genes Dev.* **19**, 2816–2826.
- Kabsch, W. (2010). *Acta Cryst. D* **66**, 125–132.
- Koga, Y., Kyuragi, T., Nishihara, M. & Sone, N. (1998). *J. Mol. Evol.* **46**, 54–63.
- Larsson, C., Pihlman, I. L., Ansell, R., Rigoulet, M., Adler, L. & Gustafsson, L. (1998). *Yeast*, **14**, 347–357.
- Lesley, S. A. *et al.* (2002). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **99**, 11664–11669.
- Linn, E. C. C. (1976). *Annu. Rev. Microbiol.* **30**, 535–578.
- Lo, T. W. C., Westwood, M. E., McLellan, A. C., Selwood, T. & Thornalley, P. J. (1994). *J. Biol. Chem.* **269**, 32299–32305.
- Martins, A. M. T. B. S., Cordeiro, C. A. A. & Ponces Freire, A. M. J. (2001). *FEBS Lett.* **499**, 41–44.
- McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C. & Read, R. J. (2007). *J. Appl. Cryst.* **40**, 658–674.
- Marshudov, G. N., Skubák, P., Lebedev, A. A., Pannu, N. S., Steiner, R. A., Nicholls, R. A., Winn, M. D., Long, F. & Vagin, A. A. (2011). *Acta Cryst. D* **67**, 355–367.
- Nishihara, M. & Koga, Y. (1995). *J. Biochem.* **117**, 933–935.
- Ou, X., Ji, C., Han, X., Zhao, X., Li, X., Mao, Y., Wong, L.-L., Bartlam, M. & Rao, Z. (2006). *J. Mol. Biol.* **357**, 858–869.
- Rao, S. T. & Rossmann, M. G. (1973). *J. Mol. Biol.* **76**, 241–256.
- Richard, J. P. (1984). *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 4926–4936.
- Richter, N., Breicha, K., Hummel, W. & Niefind, K. (2010). *J. Mol. Biol.* **404**, 353–362.
- Ruzhnikov, S. N., Burke, J., Sedelnikova, S., Baker, P. J., Taylor, R., Bullough, P. A., Muir, N. M., Gore, M. G. & Rice, D. W. (2001). *Structure*, **9**, 789–802.
- Sakasegawa, S.-I., Hagemeyer, C. H., Thauer, R. K., Essen, L.-O. & Shima, S. (2004). *Protein Sci.* **13**, 3161–3171.
- Shen, W., Wei, Y., Dauk, M., Zheng, Z. & Zou, J. (2003). *FEBS Lett.* **536**, 92–96.
- White, H. B. & Kaplan, N. O. (1969). *J. Biol. Chem.* **244**, 6031–6039.
- Yeh, J. I., Chintre, U. & Du, S. (2008). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **105**, 3280–3285.

BIBLIOGRAFÍA

8. Bibliografía

Albertini, M., Rehling, P., Erdmann, R., Girzalsky, W., Kiel, J.A., Veenhuis, M., and Kunau, W.H. (1997). Pex14, a peroxisomal membrane protein binding both receptors of the two PTS-dependent import pathways. *Cell* 89, 83-92.

An, J., Muoio, D.M., Shiota, M., Fujimoto, Y., Cline, G.W., Shulman, G.I., Koves, T.R., Stevens, R., Millington, D., and Newgard, C.B. (2004). Hepatic expression of malonyl-CoA decarboxylase reverses muscle, liver and whole-animal insulin resistance. *Nat Med* 10, 268-274.

Antonenkov, V.D., Grunau, S., Ohlmeier, S., and Hiltunen, J.K. (2009). Peroxisomes are oxidative organelles. *Antioxid Redox Signal* 13, 525-537.

Antonenkov, V.D., and Hiltunen, J.K. (2006). Peroxisomal membrane permeability and solute transfer. *Biochim Biophys Acta* 1763, 1697-1706.

Antonenkov, V.D., Van Veldhoven, P.P., Waelkens, E., and Mannaerts, G.P. (1999). Comparison of the stability and substrate specificity of purified peroxisomal 3-oxoacyl-CoA thiolases A and B from rat liver. *Biochim Biophys Acta* 1437, 136-141.

Bairoch, A., Apweiler, R., Wu, C.H., Barker, W.C., Boeckmann, B., Ferro, S., Gasteiger, E., Huang, H., Lopez, R., Magrane, M., *et al.* (2005). The Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res* 33, D154-159.

Baldwin, J.E., and Krebs, H. (1981). The evolution of metabolic cycles. *Nature* 291, 381-382.

Baumgart, E., Vanhooren, J.C., Fransen, M., Marynen, P., Puype, M., Vandekerckhove, J., Leunissen, J.A., Fahimi, H.D., Mannaerts, G.P., and van Veldhoven, P.P. (1996). Molecular characterization of the human peroxisomal branched-chain acyl-CoA oxidase: cDNA cloning, chromosomal assignment, tissue distribution, and evidence for the absence of the protein in Zellweger syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13748-13753.

Biermann, J., Just, W.W., Wanders, R.J., and Van Den Bosch, H. (1999). Alkyl-dihydroxyacetone phosphate synthase and dihydroxyacetone phosphate acyltransferase form a protein complex in peroxisomes. *Eur J Biochem* 261, 492-499.

Birschmann, I., Stroobants, A.K., van den Berg, M., Schafer, A., Rosenkranz, K., Kunau, W.H., and Tabak, H.F. (2003). Pex15p of *Saccharomyces cerevisiae* provides a molecular basis for recruitment of the AAA peroxin Pex6p to peroxisomal membranes. *Mol Biol Cell* 14, 2226-2236.

Blanc, E., Roversi, P., Vonnrhein, C., Flensburg, C., Lea, S.M., and Bricogne, G. (2004). Refinement of severely incomplete structures with maximum likelihood in BUSTER-TNT. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 2210-2221.

Bouzakri, K., Austin, R., Rune, A., Lassman, M.E., Garcia-Roves, P.M., Berger, J.P., Krook, A., Chibalin, A.V., Zhang, B.B., and Zierath, J.R. (2008). Malonyl CoenzymeA decarboxylase regulates lipid and glucose metabolism in human skeletal muscle. *Diabetes* 57, 1508-1516.

Brocard, C., and Hartig, A. (2006). Peroxisome targeting signal 1: is it really a simple tripeptide? *Biochim Biophys Acta* 1763, 1565-1573.

Clevers, H. (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127, 469-480.

Cline, G.W., Petersen, K.F., Krssak, M., Shen, J., Hundal, R.S., Trajanoski, Z., Inzucchi, S., Dresner, A., Rothman, D.L., and Shulman, G.I. (1999). Impaired glucose transport as a cause of decreased insulin-stimulated muscle glycogen synthesis in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 341, 240-246.

Collins, C.S., Kalish, J.E., Morrell, J.C., McCaffery, J.M., and Gould, S.J. (2000). The peroxisome biogenesis factors pex4p, pex22p, pex1p, and pex6p act in the terminal steps of peroxisomal matrix protein import. *Mol Cell Biol* 20, 7516-7526.

Costa-Rodrigues, J., Carvalho, A.F., Gouveia, A.M., Fransen, M., Sa-Miranda, C., and Azevedo, J.E. (2004). The N terminus of the peroxisomal cycling receptor, Pex5p, is required for redirecting the peroxisome-associated peroxin back to the cytosol. *J Biol Chem* 279, 46573-46579.

Covarrubias, L., Hernandez-Garcia, D., Schnabel, D., Salas-Vidal, E., and Castro-Obregon, S. (2008). Function of reactive oxygen species during animal development: passive or active? *Dev Biol* 320, 1-11.

Cozzone, D., Debard, C., Dif, N., Ricard, N., Disse, E., Vouillarmet, J., Rabasa-Lhoret, R., Laville, M., Pruneau, D., Rieusset, J., *et al.* (2006). Activation of liver X receptors promotes lipid accumulation but does not alter insulin action in human skeletal muscle cells. *Diabetologia* 49, 990-999.

Chang, C.C., Warren, D.S., Sacksteder, K.A., and Gould, S.J. (1999). Pex12 Interacts with Pex5 and Pex10 and acts down-stream of receptor docking in peroxisomal matrix protein import. *J Cell Biol* 147, 761-774.

Chen, J.Y., and Martin, N.C. (1988). Biosynthesis of tRNA in yeast mitochondria. An endonuclease is responsible for the 3'-processing of tRNA precursors. *J Biol Chem* 263, 13677-13682.

Chibalin, A.V., Leng, Y., Vieira, E., Krook, A., Bjornholm, M., Long, Y.C., Kotova, O., Zhong, Z., Sakane, F., Steiler, T., *et al.* (2008). Downregulation of diacylglycerol kinase delta contributes to hyperglycemia-induced insulin resistance. *Cell* 132, 375-386.

Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, G., Giustarini, D., and Milzani, A. (2009). Protein S-glutathionylation: a regulatory device from bacteria to humans. *Trends Biochem Sci* 34, 85-96.

Dammai, V., and Subramani, S. (2001). The human peroxisomal targeting signal receptor, Pex5p, is translocated into the peroxisomal matrix and recycled to the cytosol. *Cell* 105, 187-196.

Datta, S.C., Ghosh, M.K., and Hajra, A.K. (1990). Purification and properties of acyl/alkyl dihydroxyacetone-phosphate reductase from guinea pig liver peroxisomes. *J Biol Chem* 265, 8268-8274.

De Duve, C., and Baudhuin, P. (1966). Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol Rev* 46, 323-357.

de Vries, S.J., van Dijk, M., and Bonvin, A.M. The HADDOCK web server for data-driven biomolecular docking. *Nat Protoc* 5, 883-897.

Debard, C., Cozzone, D., Ricard, N., Vouillarmet, J., Disse, E., Husson, B., Laville, M., and Vidal, H. (2006). Short-term activation of peroxysome proliferator-activated receptor beta/delta increases fatty acid oxidation but does not restore insulin action in muscle cells from type 2 diabetic patients. *J Mol Med (Berl)* 84, 747-752.

Dodt, G., and Gould, S.J. (1996). Multiple Pex genes are required for proper subcellular distribution and stability of pex5p, the PTS1 receptor: evidence that PTS1 protein import is mediated by a cycling receptor. *J Cell Biol* 135, 1763-1774.

Dresner, A., Laurent, D., Marcucci, M., Griffin, M.E., Dufour, S., Cline, G.W., Slezak, L.A., Andersen, D.K., Hundal, R.S., Rothman, D.L., *et al.* (1999). Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest* 103, 253-259.

Dyck, J.R., Cheng, J.F., Stanley, W.C., Barr, R., Chandler, M.P., Brown, S., Wallace, D., Arrhenius, T., Harmon, C., Yang, G., *et al.* (2004). Malonyl coenzyme a decarboxylase inhibition protects the ischemic heart by inhibiting fatty acid oxidation and stimulating glucose oxidation. *Circ Res* 94, e78-84.

Emsley, P., and Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 2126-2132.

Erdmann, I.H.a.R. (2005). Biogenesis of peroxisomes: Topogenesis of the peroxisomal membrane and matrix proteins. *FEBS J* 272, 2362-2372.

Fersht, A.R. (1975). Demonstration of two active sites on a monomeric aminoacyl-tRNA synthetase. Possible roles of negative cooperativity and half-of-the-sites reactivity in oligomeric enzymes. *Biochemistry* 14, 5-12.

Finck, B.N. (2007). The PPAR regulatory system in cardiac physiology and disease. *Cardiovasc Res* 73, 269-277.

Footitt, E.J., Stafford, J., Dixon, M., Burch, M., Jakobs, C., Salomons, G.S., and Cleary, M.A. (2010). Use of a long-chain triglyceride-restricted/medium-chain triglyceride-supplemented diet in a case of malonyl-CoA decarboxylase deficiency with cardiomyopathy *J Inherit Metab Dis*

French, W.L., and Wilson, C.R. (1978). Genetic and Phenogenetic Studies on the Dynamic Nature of the Cytoplasmic Inheritance System in *CULEX PIPIENS*. *Genetics* 88, 447-455.

Funato, Y., Michiue, T., Asashima, M., and Miki, H. (2006). The thioredoxin-related redox-regulating protein nucleoredoxin inhibits Wnt-beta-catenin signalling through dishevelled. *Nat Cell Biol* 8, 501-508.

Geuze, H.J., Murk, J.L., Stroobants, A.K., Griffith, J.M., Kleijmeer, M.J., Koster, A.J., Verkley, A.J., Distel, B., and Tabak, H.F. (2003). Involvement of the endoplasmic reticulum in peroxisome formation. *Mol Biol Cell* 14, 2900-2907.

Goodwin, G.W., and Taegtmeyer, H. (1999). Regulation of fatty acid oxidation of the heart by MCD and ACC during contractile stimulation. *Am J Physiol* 277, E772-777.

Grou, C.P., Carvalho, A.F., Pinto, M.P., Wiese, S., Piechura, H., Meyer, H.E., Warscheid, B., Sa-Miranda, C., and Azevedo, J.E. (2008). Members of the E2D (UbcH5) family mediate the ubiquitination of the conserved cysteine of Pex5p, the peroxisomal import receptor. *J Biol Chem* 283, 14190-14197.

Gu, L., Geders, T.W., Wang, B., Gerwick, W.H., Hakansson, K., Smith, J.L., and Sherman, D.H. (2007). GNAT-like strategy for polyketide chain initiation. *Science* 318, 970-974.

Harmancey, R., Wilson, C.R., and Taegtmeyer, H. (2008). Adaptation and maladaptation of the heart in obesity. *Hypertension* 52, 181-187.

Hayaishi, O. (1955). Enzymatic decarboxylation of malonic acid. *J Biol Chem* 215, 125-136.

Hernandez-Garcia, D., Wood, C.D., Castro-Obregon, S., and Covarrubias, L. Reactive oxygen species: A radical role in development? *Free Radic Biol Med* 49, 130-143.

Hiltunen, J.K., Schonauer, M.S., Autio, K.J., Mittelmeier, T.M., Kastaniotis, A.J., and Dieckmann, C.L. (2009). Mitochondrial fatty acid synthesis type II: more than just fatty acids. *J Biol Chem* 284, 9011-9015.

Holm, L., Kaariainen, S., Wilton, C., and Plewczynski, D. (2006). Using Dali for structural comparison of proteins. *Curr Protoc Bioinformatics Chapter 5, Unit 5* 5.

Hollingsworth, M.J., and Martin, N.C. (1987). Alteration of a mitochondrial tRNA precursor 5' leader abolishes its cleavage by yeast mitochondrial RNase P. *Nucleic Acids Res* 15, 8845-8860.

Hopkins, T.A., Dyck, J.R., and Lopaschuk, G.D. (2003). AMP-activated protein kinase regulation of fatty acid oxidation in the ischaemic heart. *Biochem Soc Trans* 31, 207-212.

Hue, L., and Taegtmeyer, H. (2009). The Randle cycle revisited: a new head for an old hat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297, E578-591.

Jang, S.H., Cheesbrough, T.M., and Kolattukudy, P.E. (1989). Molecular cloning, nucleotide sequence, and tissue distribution of malonyl-CoA decarboxylase. *J Biol Chem* 264, 3500-3505.

Joly, E., Bendayan, M., Roduit, R., Saha, A.K., Ruderman, N.B., and Prentki, M. (2005). Malonyl-CoA decarboxylase is present in the cytosolic, mitochondrial and peroxisomal compartments of rat hepatocytes. *FEBS Lett* 579, 6581-6586.

Kabsch, W. (2010). XDS. *Acta Crystallogr A* 66, 125-132.

Kelley, D.E., Goodpaster, B., Wing, R.R., and Simoneau, J.A. (1999). Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss. *Am J Physiol* 277, E1130-1141.

Kelley, D.E., Goodpaster, B.H., and Storlien, L. (2002a). Muscle triglyceride and insulin resistance. *Annu Rev Nutr* 22, 325-346.

Kelley, D.E., He, J., Menshikova, E.V., and Ritov, V.B. (2002b). Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* 51, 2944-2950.

Kiel, J.A., Emmrich, K., Meyer, H.E., and Kunau, W.H. (2005). Ubiquitination of the peroxisomal targeting signal type 1 receptor, Pex5p, suggests the presence

of a quality control mechanism during peroxisomal matrix protein import. *J Biol Chem* 280, 1921-1930.

Kim, Y.S., and Kolattukudy, P.E. (1978). Purification and properties of malonyl-CoA decarboxylase from rat liver mitochondria and its immunological comparison with the enzymes from rat brain, heart, and mammary gland. *Arch Biochem Biophys* 190, 234-246.

Koepke, J.I., Wood, C.S., Terlecky, L.J., Walton, P.A., and Terlecky, S.R. (2008). Progeric effects of catalase inactivation in human cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 232, 99-108.

Kolattukudy, P.E., Poulouse, A.J., and Kim, Y.S. (1981). Malonyl-CoA decarboxylase from avian, mammalian, and microbial sources. *Methods Enzymol* 71 Pt C, 150-163.

Koller, A., Snyder, W.B., Faber, K.N., Wenzel, T.J., Rangell, L., Keller, G.A., and Subramani, S. (1999). Pex22p of *Pichia pastoris*, essential for peroxisomal matrix protein import, anchors the ubiquitin-conjugating enzyme, Pex4p, on the peroxisomal membrane. *J Cell Biol* 146, 99-112.

Kregel, K.C., and Zhang, H.J. (2007). An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292, R18-36.

Kunau, W.H. (2005). Peroxisome biogenesis: end of the debate. *Curr Biol* 15, R774-776.

Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., and Thornton, J.M. (1993). PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 26, 283-291.

Lazarow, P.B. (2003). Peroxisome biogenesis: advances and conundrums. *Curr Opin Cell Biol* 15, 489-497.

Leon, S., Zhang, L., McDonald, W.H., Yates, J., 3rd, Cregg, J.M., and Subramani, S. (2006). Dynamics of the peroxisomal import cycle of PpPex20p: ubiquitin-dependent localization and regulation. *J Cell Biol* 172, 67-78.

Lin, T.K., Hughes, G., Muratovska, A., Blaikie, F.H., Brookes, P.S., Darley-Usmar, V., Smith, R.A., and Murphy, M.P. (2002). Specific modification of mitochondrial protein thiols in response to oxidative stress: a proteomics approach. *J Biol Chem* 277, 17048-17056.

Lopaschuk, G. (2004). The role of fatty acid oxidation in cardiac ischemia and reperfusion. *Advanced studies in medicine* 4, 803-807.

Ma, C., Agrawal, G., and Subramani, S. (2011). Peroxisome assembly: matrix and membrane protein biogenesis. *J Cell Biol* 193, 7-16.

Ma, C., and Subramani, S. (2009). Peroxisome matrix and membrane protein biogenesis. *IUBMB Life* 61, 713-722.

Madrid, K.P., De Crescenzo, G., Want, S., and Jardim, A. (2004). A modulation of the *Leishmania donovani* peroxin 5 quaternary structure by peroxisomal targeting signal 1 ligands. *Mol cell Biol* 24.

McCoy, A.J. (2007). Solving structures of protein complexes by molecular replacement with Phaser. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 63, 32-41.

McGarry, J.D. (1998). Glucose-fatty acid interactions in health and disease. *Am J Clin Nutr* 67, 500S-504S.

McGarry, J.D., Mills, S.E., Long, C.S., and Foster, D.W. (1983). Observations on the affinity for carnitine, and malonyl-CoA sensitivity, of carnitine palmitoyltransferase I in animal and human tissues. Demonstration of the presence of malonyl-CoA in non-hepatic tissues of the rat. *Biochem J* 214, 21-28.

Meinecke, M., Cizmowski, C., Schliebs, W., Krüger, V., Beck, S., Wagner, R., and Erdmann, R. (2010). The peroxisomal importomer constitutes a large and highly dynamic pore. *Nat Cell Biol* 12, 273-277.

Mihalik, S.J., McGuinness, M., and Watkins, P.A. (1991). Purification and characterization of peroxisomal L-pipecolic acid oxidase from monkey liver. *J Biol Chem* 266, 4822-4830.

Morino, K., Petersen, K.F., and Shulman, G.I. (2006). Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction. *Diabetes* 55 Suppl 2, S9-S15.

Mukai, S., and Fujiki, Y. (2006). Molecular mechanisms of import of peroxisome-targeting signal type 2 (PTS2) proteins by PTS2 receptor Pex7p and PTS1 receptor Pex5pL. *J Biol Chem* 281, 37311-37320.

Muoio, D.M., and Newgard, C.B. (2006). Obesity-related derangements in metabolic regulation. *Annu Rev Biochem* 75, 367-401.

Muoio, D.M., and Newgard, C.B. (2008). Mechanisms of disease: molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 193-205.

Murshudov, G.N., Vagin, A.A., and Dodson, E.J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 53, 240-255.

- Nagan, N., and Zoeller, R.A. (2001). Plasmalogens: biosynthesis and functions. *Prog Lipid Res* 40, 199-229.
- Neuberger, G., Maurer-Stroh, S., Eisenhaber, B., Hartig, A., and Eisenhaber, F. (2003). Motif refinement of the peroxisomal targeting signal 1 and evaluation of taxon-specific differences. *J Mol Biol* 328, 567-579.
- Niesen, F.H., Berglund, H., and Vedadi, M. (2007). The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nat Protoc* 2, 2212-2221.
- Ofman, R., and Wanders, R.J. (1994). Purification of peroxisomal acyl-CoA: dihydroxyacetonephosphate acyltransferase from human placenta. *Biochim Biophys Acta* 1206, 27-34.
- Oliveira, M.E., Gouveia, A.M., Pinto, R.A., Sa-Miranda, C., and Azevedo, J.E. (2003). The energetics of Pex5p-mediated peroxisomal protein import. *J Biol Chem* 278, 39483-39488.
- Otera, H., Setoguchi, K., Hamasaki, M., Kumishiro, T., Shimizu, N., and Fujiki, Y. (2002). Peroxisomal targeting signal receptor Pex5p interacts with cargoes and import machinery components in a spatiotemporally differentiated manner: conserved Pex5 p WxxxF/Y motifs are critical for matrix protein import. *Mol Biol Cell* 22, 1639-1655.
- Park, H., Kaushik, V.K., Constant, S., Prentki, M., Przybytkowski, E., Ruderman, N.B., and Saha, A.K. (2002). Coordinate regulation of malonyl-CoA decarboxylase, sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, and acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase in rat tissues in response to exercise. *J Biol Chem* 277, 32571-32577.
- Paulsen, C.E., and Carroll, K.S. (2009). Orchestrating redox signaling networks through regulatory cysteine switches *ACS Chem Biol* 5, 47-62.
- Pires, J.R., Hong, X., Brockmann, C., Volkmer-Engert, R., Schneider-Mergener, J., Oschkinat, H., and Erdmann, R. (2003). The ScPex13p SH3 domain exposes two distinct binding sites for Pex5p and Pex14p. *J Mol Biol* 326, 1427-1435.
- Platta, H.W., and Erdmann, R. (2007). The peroxisomal protein import machinery. *FEBS Lett* 581, 2811-2819.
- Platta, H.W., Girzalsky, W., and Erdmann, R. (2004). Ubiquitination of the peroxisomal import receptor Pex5p. *Biochem J* 384, 37-45.

- Platta, H.W., Grunau, S., Rosenkranz, K., Girzalsky, W., and Erdmann, R. (2005). Functional role of the AAA peroxins in dislocation of the cycling PTS1 receptor back to the cytosol. *Nat Cell Biol* 7, 817-822.
- Powers, J.M., and Moser, H.W. (1998). Peroxisomal disorders: genotype, phenotype, major neuropathologic lesions, and pathogenesis. *Brain Pathol* 8, 101-120.
- Purdue, P.E., and Lazarow, P.B. (2001). Peroxisome biogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 701-752.
- Qin, Y.M., Poutanen, M.H., Helander, H.M., Kvist, A.P., Siivari, K.M., Schmitz, W., Conzelmann, E., Hellman, U., and Hiltunen, J.K. (1997). Peroxisomal multifunctional enzyme of beta-oxidation metabolizing D-3-hydroxyacyl-CoA esters in rat liver: molecular cloning, expression and characterization. *Biochem J* 321 (Pt 1), 21-28.
- Rasmussen, B.B., and Wolfe, R.R. (1999). Regulation of fatty acid oxidation in skeletal muscle. *Annu Rev Nutr* 19, 463-484.
- Rayapuram, N., and Subramani, S. (2006). The importomer--a peroxisomal membrane complex involved in protein translocation into the peroxisome matrix. *Biochim Biophys Acta* 1763, 1613-1619.
- Ruderman, N., and Prentki, M. (2004). AMP kinase and malonyl-CoA: targets for therapy of the metabolic syndrome. *Nat Rev Drug Discov* 3, 340-351.
- Ruderman, N.B., Saha, A.K., Vavvas, D., Heydrick, S.J., and Kurowski, T.G. (1997). Lipid abnormalities in muscle of insulin-resistant rodents. The malonyl CoA hypothesis. *Ann N Y Acad Sci* 827, 221-230.
- Ruderman, N.B., Saha, A.K., Vavvas, D., and Witters, L.A. (1999). Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance. *Am J Physiol* 276, E1-E18.
- Sablina, A.A., Budanov, A.V., Ilyinskaya, G.V., Agapova, L.S., Kravchenko, J.E., and Chumakov, P.M. (2005). The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat Med* 11, 1306-1313.
- Sacksteder, K.A., Morrell, J.C., Wanders, R.J., Matalon, R., and Gould, S.J. (1999). MCD encodes peroxisomal and cytoplasmic forms of malonyl-CoA decarboxylase and is mutated in malonyl-CoA decarboxylase deficiency. *J Biol Chem* 274, 24461-24468.
- Saddik, M., Gamble, J., Witters, L.A., and Lopaschuk, G.D. (1993). Acetyl-CoA carboxylase regulation of fatty acid oxidation in the heart. *J Biol Chem* 268, 25836-25845.

- Saggerson, D. (2008). Malonyl-CoA, a key signaling molecule in mammalian cells. *Annu Rev Nutr* 28, 253-272.
- Saha, A.K., and Ruderman, N.B. (2003). Malonyl-CoA and AMP-activated protein kinase: an expanding partnership. *Mol Cell Biochem* 253, 65-70.
- Schluter, A., Fourcade, S., Ripp, R., Mandel, J.L., Poch, O., and Pujol, A. (2006). The evolutionary origin of peroxisomes: an ER-peroxisome connection. *Mol Biol Evol* 23, 838-845.
- Scholem, R.D., and Brown, G.K. (1983). Metabolism of malonic semialdehyde in man. *Biochem J* 216, 81-85.
- Schrader, M., and Fahimi, H.D. (2006). Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta* 1763, 1755-1766.
- Seedorf, U., Brysch, P., Engel, T., Schrage, K., and Assmann, G. (1994). Sterol carrier protein X is peroxisomal 3-oxoacyl coenzyme A thiolase with intrinsic sterol carrier and lipid transfer activity. *J Biol Chem* 269, 21277-21283.
- Sheldrick, G.M. (2010). Experimental phasing with SHELXC/D/E: combining chain tracing with density modification. *Acta Crystallogr A* 66, 479-485.
- Shiozawa, K., Maita, N., Tomii, K., Seto, A., Goda, N., Akiyama, Y., Shimizu, T., Shirakawa, M., and Hiroaki, H. (2004). Structure of the N-terminal domain of PEX1 AAA-ATPase. Characterization of a putative adaptor-binding domain. *J Biol Chem* 279, 50060-50068.
- Singh, I. (1996). Mammalian peroxisomes: metabolism of oxygen and reactive oxygen species. *Ann N Y Acad Sci* 804, 612-627.
- Stanley, W.A., and Wilmanns, M. (2006). Dynamic architecture of the peroxisomal import receptor Pex5p. *Biochem Biophys Acta* 1763, 1592-1598.
- Stein, P.E., Boodhoo, A., Armstrong, G.D., Cockle, S.A., Klein, M.H., and Read, R.J. (1994). The crystal structure of pertussis toxin. *Structure* 2, 45-57.
- Studier, F.W. (2005). Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif* 41, 207-234.
- Swinkels, B.W., Gould, S.J., Bodnar, A.G., Rachubinski, R.A., and Subramani, S. (1991). A novel, cleavable peroxisomal targeting signal at the amino-terminus of the rat-3ketoacyl-CoA thiolase. *EMBO J* 10, 3255-3262.
- Tam, Y.Y., Fagarasanu, A., Fagarasanu, M., and Rachubinski, R.A. (2005). Pex3p initiates the formation of a preperoxisomal compartment from a subdomain of

the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 280, 34933-34939.

Terwilliger, T.C., and Berendzen, J. (1999). Automated MAD and MIR structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 55, 849-861.

Thai, T.P., Heid, H., Rackwitz, H.R., Hunziker, A., Gorgas, K., and Just, W.W. (1997). Ether lipid biosynthesis: isolation and molecular characterization of human dihydroxyacetonephosphate acyltransferase. *FEBS Lett* 420, 205-211.

Titorenko, V.I., and Rachubinski, R.A. (2001). The life cycle of the peroxisome. *Nature reviews Molecular cell biology* 2, 357-368.

Titorenko, V.I., and Rachubinski, R.A. (2004). The peroxisome: orchestrating important developmental decisions from inside the cell. *J Cell Biol* 164, 641-645.

Titorenko, V.I., Smith, J.J., Szilard, R.K., and Rachubinski, R.A. (1998). Pex20p of the yeast *Yarrowia lipolytica* is required for the oligomerization of thiolase in the cytosol and for its targeting to the peroxisome. *J Cell Biol* 142, 403-420.

Vagelos, P.R. (1960). Propionic acid metabolism. IV. Synthesis of malonyl coenzyme A. *J Biol Chem* 235, 346-350.

Vaguin, A.A., Richelle, J., and Wodak, S.J. (1999). SFCHECK: a unified set of procedures for evaluating the quality of macromolecular structure-factor data and their agreement with the atomic model. *Acta Crystallogr D* 55, 191.

van der Zand, A., Braakman, I., and Tabak, H.F. (2010). Peroxisomal membrane proteins insert into the endoplasmic reticulum *mol Biol Cell* 21, 2057-2065.

van Grunsven, E.G., van Berkel, E., Ijlst, L., Vreken, P., de Klerk, J.B., Adamski, J., Lemonde, H., Clayton, P.T., Cuebas, D.A., and Wanders, R.J. (1998). Peroxisomal D-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: resolution of the enzyme defect and its molecular basis in bifunctional protein deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2128-2133.

Van Veldhoven, P.P., Brees, C., and Mannaerts, G.P. (1991). D-aspartate oxidase, a peroxisomal enzyme in liver of rat and man. *Biochim Biophys Acta* 1073, 203-208.

Van Veldhoven, P.P., Vanhove, G., Asselberghs, S., Eyssen, H.J., and Mannaerts, G.P. (1992). Substrate specificities of rat liver peroxisomal acyl-CoA oxidases: palmitoyl-CoA oxidase (inducible acyl-CoA oxidase), pristanoyl-CoA oxidase (non-inducible acyl-CoA oxidase), and trihydroxycoprostanoyl-CoA oxidase. *J Biol Chem* 267, 20065-20074.

Voilley, N., Roduit, R., Vicaretti, R., Bonny, C., Waeber, G., Dyck, J.R., Lopaschuk, G.D., and Prentki, M. (1999). Cloning and expression of rat pancreatic beta-cell malonyl-CoA decarboxylase. *Biochem J* 340 (Pt 1), 213-217.

Voorn-Brouwer, T., Kragt, A., Tabak, H.F., and Distel, B. (2001). Peroxisomal membrane proteins are properly targeted to peroxisomes in the absence of COPI- and COPII-mediated vesicular transport. *J Cell Sci* 114, 2199-2204.

Wanders, R.J. (2004). Metabolic and molecular basis of peroxisomal disorders: a review. *Am J Med Genet A* 126A, 355-375.

Wanders, R.J., Romeyn, G.J., Schutgens, R.B., and Tager, J.M. (1989). L-pipecolate oxidase: a distinct peroxisomal enzyme in man. *Biochem Biophys Res Commun* 164, 550-555.

Wanders, R.J., and Waterham, H.R. (2006). Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. *Annu Rev Biochem* 75, 295-332.

Wang, D., Visser, N.V., Veenhuis, M., and van der Klei, I.J. (2003). Physical interactions of the peroxisomal targeting signal 1 receptor pex5p, studied by fluorescence correlation spectroscopy. *J Biol Chem* 278, 43340-43345.

Waris, G., and Ahsan, H. (2006). Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J Carcinog* 5, 14.

Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C., Van Montagu, M., Inze, D., and Van Camp, W. (1997). Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C₃ plants. *EMBO J* 16, 4806-4816.

Williams, C., van den Berg, M., Geers, E., and Distel, B. (2008). Pex10p functions as an E3 ligase for the Ubc4p-dependent ubiquitination of Pex5p. *Biochem Biophys Res Commun* 374, 620-624.

Williams, C., Van den Berg, M., Sprenger, R.R., and Distel, B.A. (2007). A conserved cysteine is essential for Pex4p dependent ubiquitination of the peroxisomal import receptor Pex5. *J Biol Chem* 282, 22534-22543.

Witkowski, A., Thweatt, J., and Smith, S. Mammalian ACSF3 protein is a malonyl-CoA synthetase that supplies the chain extender units for mitochondrial fatty acid synthesis. *J Biol Chem* 286, 33729-33736.

Yamada, E.W., and Jakoby, W.B. (1960). Aldehyde oxidation. V. Direct conversion of malonic semialdehyde to acetyl-coenzyme A. *J Biol Chem* 235, 589-594.

Zhou, D., Yuen, P., Chu, D., Thon, V., McConnell, S., Brown, S., Tsang, A., Pena, M., Russell, A., Cheng, J.F., *et al.* (2004). Expression, purification, and characterization of human malonyl-CoA decarboxylase. *Protein Expr Purif* 34, 261-269.

Zhou, W., Tu, Y., Simpson, P.J., and Kuhajda, F.P. (2009). Malonyl-CoA decarboxylase inhibition is selectively cytotoxic to human breast cancer cells. *Oncogene* 28, 2979-2987.

Zoeller, R.A., Morand, O.H., and Raetz, C.R. (1988). A possible role for plasmalogens in protecting animal cells against photosensitized killing. *J Biol Chem* 263, 11590-11596.