

Anal. Real Acad. Nal. Farm. 2003,

\_\_\_\_\_ **Artículo Original** \_\_\_\_\_

**Deficiencias en piruvato quinasa y anemias hemolíticas\***

AMANDO GARRIDO PERTIERRA Y  
JOSÉ MANUEL BAUTISTA SANTA CRUZ

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Universidad  
Complutense de Madrid*

**RESUMEN**

La piruvato quinasa cataliza la transformación de fosfoenolpiruvato y ADP en piruvato y ATP. La enzima, que aparece en toda las células vivas, es clave en la ruta central del metabolismo de carbohidratos. La deficiencia en piruvato quinasa, debida a una mutación en el gen PK-LR, origina alteraciones únicamente, en los eritrocitos, porque estas células no son capaces de compensar el defecto enzimático. Por ello, la deficiencia de esta enzima es causa principal de la anemia hemolítica no esferocítica que puede provocar incluso la muerte de los pacientes.

Las dificultades en la caracterización bioquímica de la PK nos ha llevado a estudiar la enzimopatía mediante técnicas de Biología Molecular. El trabajo se realizó sobre 10 pacientes con deficiencia en piruvato quinasa eritrocitaria. Mediante análisis molecular se han encontrado 11 mutaciones diferentes en los 17 alelos mutados: tres de estas mutaciones, G694A, A1150G y G1154A, no habían sido previamente descritas.

A las mutaciones que originan fuertes modificaciones en la estructura local de la molécula, observadas mediante estudios de modelización molecular, como consecuencia de

---

\* Premio de la Real Academia Nacional de Farmacia 2002

un desajuste en el balance de las cargas eléctricas o por impedimento estérico, corresponden valores disminuidos de la actividad de la enzima en aquellos pacientes portadores de dichas mutaciones.

**Palabras Clave:** Enzimopatía eritrocitos.— Anemias hemolíticas.— Mutaciones PK

### SUMMARY

#### Pyruvate kinase deficiencies and hemolytic anemias

The enzyme pyruvate kinase (PK) catalyses the transformation of phosphoenolpyruvate and ADP to pyruvate and ATP. The activity of this ubiquitous enzyme is essential for the central carbohydrate metabolism. Deficiency in PK activity causes non-espherocytic haemolytic anaemia, due to alterations in the metabolism of erythrocytes. The red cell lacks alternate metabolic pathways for pyruvate, and can not cope with the enzymatic fault by increasing the synthesis of the protein. Clinical symptoms in patients harbouring a PK deficiency with anaemia, which may lead to death.

Several difficulties appear in the biochemistry characterization of the enzyme, which led to the application of molecular biology tools. The present work was performed on 10 PK deficient patients. By means of molecular analysis, we have found 11 different mutations in the 17 alleles analysed, three of which, G694A, A1150G y G1154A, have not been previously reported.

Changes in the protein structure caused by mutations which introduce steric hindrance or substitutions in charged residues, analysed by molecular modeling, showed a clear correlation with the reduction in PK activity in the patients studied.

**Key words:** Erythrocyte enzymopathies.— Haemolytic anemias.— Mutations PK

### Introducción

Los hematíes, eritrocitos o glóbulos rojos son células sanguíneas, que además de transportar el oxígeno desde los pulmones a los tejidos, realizan también otras funciones importantes y por ello contienen varios catabolitos y enzimas. Aunque los eritrocitos maduros no tienen núcleo, mitocondrias, ni retículo endoplásmico y por ello no puede sintetizar proteínas, glucógeno, lípidos, ni llevar a cabo la fosforilación oxidativa son capaces de metabolizar la glucosa y otros monosacáridos. En consecuencia, su metabolismo, muy reducido, queda limitado a la glucólisis, ruta de las pentosas fosfato, ciclo del

2,3-bisfosfoglicerato, reacciones de oxidorreducción para la desintoxicación de sustancias oxidantes y ciertos aspectos del metabolismo nucleotídico (Fig.1). Estas rutas y reacciones son justamente las precisas para mantener sus necesidades metabólicas durante su vida media celular y sintetizar ATP y NADPH. La glucólisis comienza con la incorporación de monosacáridos a la célula; la glucosa 6-fosfato que se forma se isomeriza a fructosa-6-fosfato, mediante la fosfohexosa isomerasa, iniciándose así la secuencia de reacciones características de la glucólisis hasta la formación de lactato como producto final (1,2).

Se conocen todos los valores de la actividad enzimática eritrocitaria en condiciones estándar de ensayo y saturantes de sustratos, en las que se consigue la máxima actividad; sin embargo estas condiciones raramente coinciden con la situación *in vivo*, puesto que las concentraciones de los sustratos, el pH o la temperatura empleados para su medida experimental no son los que existen en la célula. Asimismo, tampoco *in vitro* se tiene en cuenta el efecto activador o inhibidor de muchos metabolitos intracelulares o la interacción mutua de las innumerables proteínas presentes (3).

El control de la glucólisis en el eritrocito se ejerce mediante la acción de distintos metabolitos sobre las tres enzimas que catalizan reacciones irreversibles, y que cumplen con todas las condiciones para considerarlas reguladoras. El efector más importante es el ATP que, al sobrepasar determinados niveles, inhibe la actividad de la fosfofructoquinasa y la piruvato quinasa. (3,4,5,6)

En la ruta glucolítica de los eritrocitos existe una desviación a nivel del 1,3-bisfosfoglicerato en la que, a partir de esta sustancia, por acción de la bisfosfoglicerato mutasa, se produce 2,3-bisfosfoglicerato (Fig.1). La enzima requiere 3-fosfoglicerato como cofactor y es inhibida por el propio producto de la reacción, el 2,3-bis-fosfoglicerato. El 2,3-bisfosfoglicerato juega un papel esencial en la regulación de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno en los tejidos. El mecanismo de control se basa en la capacidad que tiene el 2,3-bisfosfoglicerato para unirse específicamente a los residuos

básicos de la cavidad existente entre las dos cadenas β de la desoxihemoglobina, pero no de la oxihemoglobina. El significado fisiológico del 2,3-bisfosfoglicerato se encuentra en su papel estabilizador de la estructura cuaternaria de la desoxihemoglobina (6).

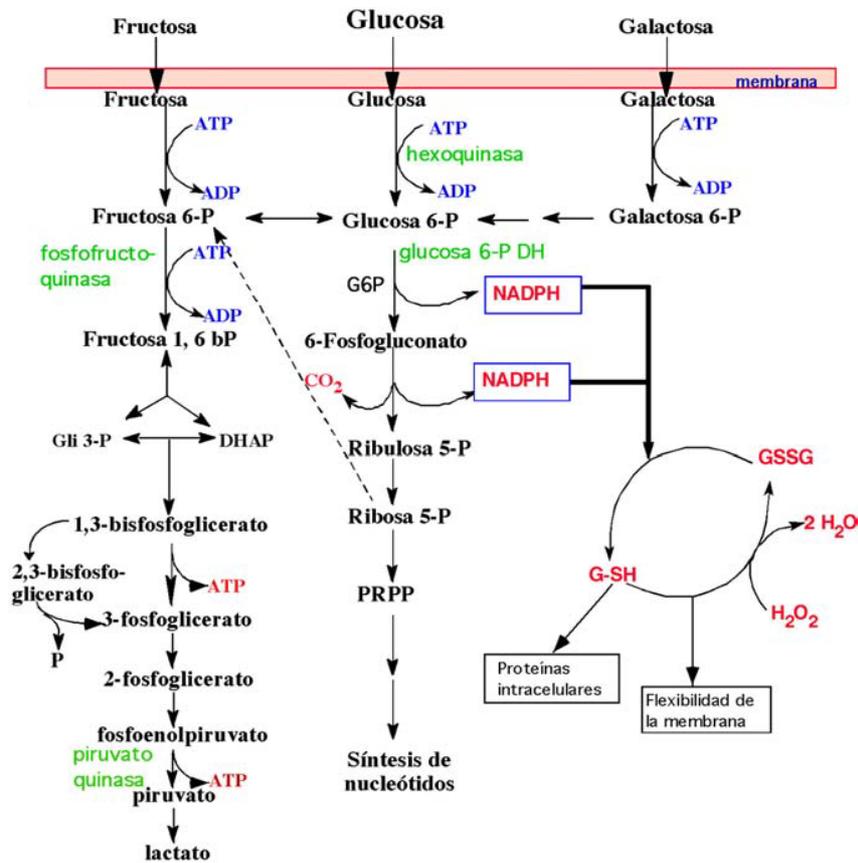


Figura 1. Rutas metabólicas en los eritrocitos. Las enzimas reguladoras se muestran en color verde.

Las anemias hemolíticas se originan por diferentes alteraciones de los eritrocitos, muchas de las cuales son hereditarias. Las células, que presentan gran fragilidad, se rompen al pasar por los capilares, especialmente en el bazo. En ocasiones el número de eritrocitos formados es normal, o incluso mayor de lo normal, pero su vida es tan corta que se produce una anemia grave (7, 8). Entre las anemias hemolíticas más frecuentes se encuentra las enzimopatías eritrocitarias las cuales son debidas a una deficiencia en algunas de las enzimas del metabolismo intermediario del eritrocito, generalmente las del metabolismo de la glucosa. Todas se caracterizan, en general, por la ausencia de esferocitosis y por valores no normales de la presión osmótica y la concentración de hemoglobina.

Los defectos enzimáticos pueden aparecer bajo formas homocigóticas o heterocigóticas, y acompañados de hemólisis celular, cuyo mecanismo desencadenante depende de la lesión molecular. El conocimiento de la sintomatología que presentan estas alteraciones ha resultado un escollo difícil de superar ya que aparecen diferentes tipos de anemias hemolíticas y, por ello, se han requerido numerosos estudios experimentales y clínicos. Los eritrocitos a lo largo de su vida realizan cerca de medio millón de ciclos, por lo que requieren un continuo suministro de ATP y equivalentes redox para mantener la estructura bicóncava, las concentraciones catiónicas intracelulares adecuadas y para conservar en estado reducido los iones de hierro de la hemoglobina, de los grupos sulfhidrilo de las enzimas, del glutatión y de los componentes de la membrana (9, 10).

La piruvato quinasa (ATP: piruvato 2-O-fosfotransferasa; EC 2.7.1.40) es una enzima que cataliza la transformación de fosfoenolpiruvato y ADP en piruvato y ATP. La reacción es la segunda de la ruta glicolítica que genera ATP. En los eritrocitos los iones potasio y los bivalentes manganeso son absolutamente necesarios para la actividad de la enzima, que es clave en la ruta central del metabolismo de los hidratos de carbono y aparece en todas las células vivas (10,11,12).

En la especie humana se han identificado dos genes codificantes de la piruvato quinasa, el PK-M y el PK-LR. En el proceso de transcripción, estos genes originan 4 isoenzimas diferentes con actividad piruvato quinasa, denominados M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, L y R, las cuales se expresan de forma diferente en cada tejido u órgano (11, 13). Todas las formas consisten en tetrámeros con subunidades de unos 50-60 kDa, y muestran algunas propiedades moleculares y físico-químicas similares, pero difieren en sus propiedades cinéticas y reguladoras.

Las isoenzimas PK-L y PK-R se encuentra bajo el control del mismo locus genético (PK-LR) pero los proceso de traducción utilizan un ARN mensajero y promotores específicos diferentes. La PK-R es muy sensible a la modulación alostérica por la fructosa 1,6-bisfosfato y, cantidades micromoleculares de este intermediario, aumentan significativamente la afinidad de la enzima por el sustrato, PEP, convirtiendo la cinética sigmoide en hiperbólica. Las propiedades cinéticas de esta enzima, pueden explicarse fácilmente según el modelo concertado de enzimas alostéricas de Monod y col. (15). Así, la enzima, se puede encontrar en un equilibrio transicional entre dos conformaciones,  $R \rightleftharpoons T$ , relajada y tensada. La forma T no tiene afinidad por  $K^+$  y muy poca por el PEP y su cinética es sigmoide, mientras la forma R tiene alta afinidad por  $K^+$  y por PEP. A partir de los datos cinéticos, se ha llegado a la conclusión de que la unión  $K^+$  es esencial para la posterior unión del PEP. Los efectores positivos fructosa 1,6-bisfosfato, fructosa 2,6-bisfosfato y 6-fosfogluconato disminuyen la cooperatividad de la PK-R hacia PEP, porque el equilibrio  $R \rightleftharpoons T$  se desplaza hacia el estado R. Los efectores negativos, ATP y alanina, operan en sentido opuesto (16).

El gen PK-LR se localiza en el brazo largo del cromosoma 1 y en la posición 21. Su tamaño es de alrededor de 8600 pb y comprende 12 exones y 11 intrones (13, 17, 18). La cadena polipeptídica de PK-R de eritrocitos humanos tiene 574 aminoácidos de longitud y la PK-L 543. Esta diferencia de longitud entre las dos isoenzimas resulta de que el primer exón de la PK-

R codifica 33 aminoácidos, mientras que el primero de la PK-L codifica únicamente dos.

El promotor del gen PK de eritrocitos humanos, que no se puede considerar un verdadero promotor constitutivo, fue identificado comparando secuencias de ADN genómico clonado con cADNs específicos y con genes de rata caracterizados previamente (13,14). La expresión transitoria en células eritroleucémicas K 562 con varios promotores truncados construidos dirigiendo un gen indicador CAT demostraron que la secuencia de 270 bp adyacente al extremo 5' era esencial para la actividad del promotor. Esta secuencia contiene varios GATA y CAC que según parece dirigen cooperativamente la transcripción específica en los eritrocitos.

Hasta el momento actual no se han encontrado mutaciones en el ADN del exón 1(R) ni del exón 1(L) del gen PK-L. Las alteraciones en las funciones celulares por una deficiencia PK afecta únicamente a los eritrocitos porque estos no son capaces de compensar el defecto enzimático aumentando la síntesis de la enzima mutada ni utilizando otras rutas alternativas (19,20). Varios de los pacientes que sufren una enzimopatía PK se caracterizan por tener una baja actividad catalítica junto con la pérdida de sus propiedades alostéricas y un aumento de la afinidad por el PEP. En raras ocasiones se originan cambios en la afinidad por el ADP.

En España la primera deficiencia en PK de eritrocitos fue encontrada en 1977 por Kahn y col. (21), que, en ese mismo año, descubrieron también esta frecuencia en seis pacientes relacionados familiarmente (22). El cADN de la PK-LR ha sido clonado y secuenciado en 1988 (23). En la actualidad han sido identificados más de 400 variantes defectivas en piruvato quinasa y 142 mutaciones diferentes (24, 25, 26). Aunque puede parecer que la distribución de las mutaciones a lo largo del cromosoma es regular, hay una tendencia de las mutaciones a acumularse principalmente en los exones 8, 9, 10 y 11 (27). Mas aún, la gran multiplicidad de los mutantes PK surge del hecho de que los dos alelos de un paciente estén afectados por mutaciones distintas resultando un mutante con dos subunidades diferentes cambiadas, esto es un heterocigo-

to. Es de destacar que varias de las estas mutaciones están localizadas en regiones de los dominios C y A, entre los cuales se encuentra el centro activo y son responsables de la unión al  $K^+$  y al  $Mn^{2+}$  (28, 29).

Un descenso de la actividad PK causa, a su vez, un descenso notable en la producción de ATP y un aumento en la concentración de PEP. Como consecuencia de este incremento en la concentración de PEP, se produce un aumento en las concentraciones intracelulares de todos los metabolitos de la ruta por encima del bloqueo, particularmente del 2,3-bisfosfoglicarato y 3-fosfoglicerato. Las concentraciones de 2,3-bisfosfoglicarato aumentan del orden de dos, tres y hasta cuatro veces por encima del valor normal, y esto es suficiente para cambiar la curva de disociación. Concentraciones elevadas de 2,3-bisfosfoglicerato pueden causar también efectos deletéreos inhibiendo otras enzimas que limitan el flujo metabólico de la ruta glucolítica, principalmente la fosfofructoquinasa y la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa y en la ruta de las pentosas fosfato la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (30, 31). Este hecho contribuye a la presencia de anemia hemolítica en individuos deficientes en PK que se agrava notablemente en periodos de infección o estrés metabólico.

Aunque es posible determinar, con una certeza casi completa, la secuencia de aminoácidos de una proteína a partir de la secuencia nucleotídica de un gen, no se puede conocer bien la relación entre la secuencia de aminoácidos y la conformación tridimensional nativa de una proteína. Se han obtenido las secuencias aminoacídicas completas de las isoenzimas de piruvato quinasa de varias especies, desde mamíferos a microorganismos. Las comparaciones evolutivas, de modulado y la acumulación de la estructura de bases de datos ayudan a predecir patrones de plegamiento a partir de la secuencia primaria. Sin embargo, la predicción de las estructuras terciaria y cuaternaria, deben ser confirmadas mediante los estudios cristalográficos (32). Debido a las dificultades inherentes a la metodología y a las características de las enzimas, hasta la fecha, sólo se han podido obtener cristalizadas y estudiadas mediante difracción de rayos X, dos piruvato quinasa: la de músculo de gato (33, 34)

y la de músculo de conejo (35). Las enzimas de las dos especies tienen el 94% de secuencia idéntica y, especialmente la región del centro activo, se encuentra muy conservada. Por ello, la inmensa mayoría de los estudios que se realizan sobre las estructuras de las piruvato quinasa, se hace tomando como modelo las homólogas de gato y de conejo.

La deficiencia en piruvato quinasa se encuentra muy extendida a lo largo de nuestro planeta, habiendo países y regiones en que ha sido bien investigada. Sin embargo, en nuestro país, en el que se ha considerado que aparece con una frecuencia del 0,24%, se han realizado muy pocos estudios. Sería interesante obtener más información acerca de la naturaleza de las mutaciones en una población tan heterogénea genéticamente como la española.

Por ello nos propusimos realizar un trabajo con el objeto de identificar y caracterizar mutantes en el gen PK-LR que origina fenotipos deficientes en la actividad piruvato quinasa de eritrocitos humanos y localizar y estudiar los efectos de las mutaciones en la estructura tridimensional de la enzima.

### **Materiales y Métodos**

*Material biológico.* En el desarrollo del presente trabajo se han utilizado muestras de sangre proporcionadas por el Servicio de Hematología del Hospital Doce de Octubre de Madrid. Los pacientes fueron elegidos por ser portadores de anemia hemolítica no esferocítica y deficientes en piruvato quinasa. Los análisis hematológicos y las observaciones clínicas de los pacientes fueron realizados por dicho Servicio de Hematología. La deficiencia en piruvato quinasa fue diagnosticada según las normas del ICSH. Para este propósito se extrajeron unos 5 ml de sangre y se mantuvieron en tubos de polipropileno a 4°C hasta su utilización.

*Aparatos y reactivos.* Termocicladores automáticos : PCR system Perkin Elmer 2400 y Eppendorf Mastercycler gradient. Cabina : Microflow Laminer Flow Cabinet. Secuenciador Automático (ALF-Pharmacia-Biotech®). Transiluminador: ALF-Pharmacia-Biotech®. Las columnas de purificación

de ADN, las enzimas de restricción y la Taq. ADN polimerasa de Biotools. La Taq. Gold polimerasa y el Kit de aislamiento de plásmidos *High Pure Plasmid Isolation Kit* de Perkin Elmer. La proteinasa K de Gibco. Los Desoxinucleótidos (dNTPs) de Finnzymes OY, Biotools y Ecogen. Los cebadores, los oligonucleótidos y la Dynazyme de Perkin-Elmer, Cruachem y Pharmacia-Biotech. Las columnas de Chroma Spin<sup>TM</sup> de Clontech. El Kit para la extracción de ARN de Qiagen: El ladder-100<sup>TM</sup> de Pharmacia-Biotech. La T4 ADN ligasa y vector pGEM-T de Promega.

*Extracción de ADN de células nucleadas humanas.* El método seguido ha sido, fundamentalmente, el descrito por Millar y col. (36). La calidad del ADN extraído se valoró mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8% en TAE 1X.

Extracción de ARN total de sangre entera. Para la obtención del ARN de la sangre se ha utilizado un kit proporcionado por la marca QIAGEN y el procedimiento seguido fue el descrito en su manual de instrucciones Rneasy Blood Mini Handbook.

*Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).* Las disoluciones y los tampones que se utilizaron fueron: Tampón de reacción PCR: Tris-HCl, pH 9,0, 75 mM; KCl, 50 mM; KCl; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20 mM y BSA al 0,001%. Disolución de nucleótidos: Contiene los 4 desoxinucleótidos fosfato (dATP, dTTP, dCTP y dGTP) a una concentración de 10 mM. Disolución de cloruro de magnesio: La concentración de MgCl<sub>2</sub> es de 50 mM. Disoluciones de cebadores (primers): Cada disolución contiene un cebador a una concentración de 150 mg/ml.

Las secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados correspondientes a los once exones y el sentido de las cadenas han sido los siguientes:

EXON 1: Directa: 5' TATTCCATGGTCCCAGCAG 3'; Inversa 5' GGCTCCTAGTTTTCCACCCTC 3'. EXON 2: Directa: 5' GCATGGGGAGGAAGGGCAGG 3'; Inversa: 5' ATAGGCCCTGTGTGGCTGCA 3'

- EXON 3: Directa: 5' GGTTGCCTCTCATGTTCTGGG 3'; Inversa: 5'GGAAGGTGGCCAEXON
- EXON 4: Directa: 5' CGAGGTCCTGGCCACCTCC 3'; Inversa: 5' GGCCGCCTTTCCGGCCCTG 3'
- EXON 5: Directa: 5' GCAGGGGCGGGTCCCGGACT 3'; Inversa: 5' TGCCCAGCGCACG-GATGTGG 3'
- EXON 6: Directa: 5' CAACTGTGCCCCGTCCTCA 3'; Inversa: 5' GTGATGGGGAATAGCGA-CAG 3'
- EXON 7: Directa: 5' CACCTTTCTTCTCCTGCCTG 3'; Inversa: 5'CAGGTGTCCCTAAAACCCAC 3'
- EXON 8: Directa: 5' GTAGCTTGGGCAGGGTCCCC 3'; Inversa: 5' GGGCACTGGGGTATG-GAAGG 3'
- EXON 9: Directa: 5' CCTTCCATACCCCAGTGCCC 3'; Inversa: 5' GCCCACCCCTGACC-CAAAGC 3'
- EXON 10: Directa: 5' CTCGTTCACTTTCTTGC 3' Inversa: 5'GGGGCTCCTGATACAAATGG 3'
- EXON 11: Directa: 5' TGTGAGCCACCACACCTGTC 3'; Inversa: 5' CGAAGGGGCTAGATGA-CAGT 3'

La mezcla de reacción contenía por cada tubo de ensayo especial para PCR de 0,2 ml de capacidad: tampón de reacción PCR, 5 µl; disolución de NTPs, 1 µl; enzima Taq polimerasa, 1 µl y agua, 41 µl ; los volúmenes de las disoluciones de los cebadores y las concentraciones de MgCl<sub>2</sub> dependieron de las condiciones del programa y de la clase de enzima utilizada. El programa de amplificación por PCR consistió en las siguientes etapas:

1<sup>a</sup>. Temperatura: 94°C. Tiempo: 5 min con la Taq de Biotools y 10 min con la Gold. Proceso: Inicio de la desnaturalización de la doble hélice de ADN. 2<sup>a</sup>. Temperatura: 94°C. Tiempo: 30 seg. Proceso: Desnaturalización de la doble hélice de ADN en el proceso ciclico. 3<sup>a</sup>. Temperatura: 95°C. Tiempo :20 seg. Proceso: Hibridación específica entre las cadenas del cebador y las de ADN. 4<sup>a</sup>. Temperatura: 72°C. Tiempo: 20 seg. Proceso: Elongación de las cadenas sintetizadas de nuevo. 5<sup>a</sup> Temperatura: 72°C. Tiempo: 3 min. Proceso: Elongación final. 6<sup>a</sup>. Temperatura: 4°C. Tiempo: ∞ Proceso : Mantenimiento. Las etapas 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> y 4<sup>a</sup> se repitieron durante 40 ciclos

*Inserción y unión de los productos de PCR al vector pGEM<sup>®</sup>-T.* Para determinar las secuencias nucleotídicas de los genes los productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fueron insertados en el plásmido vector pGEM<sup>®</sup>-T. El procedimiento seguido ha sido el descrito en el Technical Bulletin, que acompaña al kit de Promega.

*Transformación de células de Escherichia coli con el vector ADN ligado-pGEM<sup>®</sup>-T.* El material utilizado en esta técnica ha sido: Células de *Escherichia coli* JM109 (*High Efficiency Competent*) con genotipo recA1, end A1, gyrA96, thi, hsdR17, relA1, supE44, Δ(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacIqZΔM15]. El procedimiento seguido para la transformación ha sido el descrito en el *Technical Bulletin* de Promega.

*Aislamiento de los plásmidos conteniendo los insertos.* El aislamiento de los plásmidos conteniendo los insertos fue realizado mediante el método descrito por Sambrook y col. (37)

*Aislamiento y caracterización de los insertos plasmídicos.* Para aislar y caracterizar los fragmentos de ADN insertos en los plásmidos, los vectores ADN ligado-pGEM<sup>®</sup>-T fueron digeridos con las enzimas de restricción Pst I y Sph I, cuyas secuencias objetivo se localizan en el polinker.

*Síntesis de ADN mediante la transcriptasa inversa.* La síntesis de ADN a partir de ARN de leucocitos se realizó utilizando un Kit de Promega y siguiendo las instrucciones descritas en el *Kit Transcription System*. Los exones utilizados fueron:

EXON E12-CADN: Inversa: 5' AGGGTCAGGAATAGAGAAGAGAGG3'

EXON E8-RTPC: Directa: 5' GATTGGGCGCTGCAACTTGGC3'

EXON E9-RTPCR: Directa: 5' CTCCTCAAACGACTGCCGGTGG3'

Las condiciones del PCR fueron: 1<sup>a</sup>. Temperatura: 95°C. Tiempo: 5 min. Pasado este tiempo se agregó 1 μl de la Taq de Biotools. 2<sup>a</sup>. Temperatura: 94°C. Tiempo: 45 seg. Proceso: Desnaturalización de la doble hélice de ADN en el proceso ciclico. 3<sup>a</sup>. Temperatura: 60° C. Tiempo :45 seg. Proceso:

Hibridación específica entre las cadenas del cebador y las de ADN. 4<sup>a</sup>. Temperatura: 72°C. Tiempo: 1 min. Proceso: Elongación de las cadenas sintetizadas de nuevo. 5<sup>a</sup> Temperatura: 72°C. Tiempo: 3 min. Proceso: Elongación final. 6<sup>a</sup>. Temperatura: 4°C. Tiempo: ∞ Proceso : Mantenimiento. Las etapas 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> y 4<sup>a</sup> se repitieron durante 35 ciclos.

La mezcla de reacción y las condiciones del segundo PCR fueron: Mezcla de la reacción del segundo PCR: Producto de la reacción del primer PCR. 1 µl; tampón de reacción PCR, 10 µl; Mg Cl<sub>2</sub> (50 mM), 3 µl; dNTPS, 2 µl; disolución de EPR, 2 µl; disolución de E8F, 2 µl y agua, 79 µl.

Las condiciones del PCR fueron: 1<sup>a</sup>. Temperatura: 95°C. Tiempo: 5 min. Pasado este tiempo se agregó 1 µl de la Taq polimerasa. 2<sup>a</sup>. Temperatura: 94°C. Tiempo: 45 seg. Proceso: Desnaturalización de la doble hélice de ADN en el proceso cíclico. 3<sup>a</sup>. Temperatura: 65° C. Tiempo :45 seg. Proceso: Hibridación específica entre las cadenas del cebador y las de ADN. 4<sup>a</sup>. Temperatura: 72°C. Tiempo: 1 min. Proceso: Elongación de las cadenas sintetizadas de nuevo. 5<sup>a</sup> Temperatura: 72°C. Tiempo: 3 min. Proceso: Elongación final 6<sup>a</sup>. Temperatura: 4°C. Tiempo: ∞ Proceso : Mantenimiento. Las etapas 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> y 4<sup>a</sup> se repitieron durante 35 ciclos

*Secuenciación automática de ADN.* El procedimiento de secuenciación de ADN fue realizado con un secuenciador automático y según el procedimiento descrito por Sanger (38).

*Construcción de modelos moleculares.* Los estudios sobre la estructura tridimensional de las enzimas normal y mutadas están basados en los trabajos realizados por Allen y Muirhead (39) con difracción de rayos X sobre las enzimas homólogas cristalizadas de músculo de conejo y de gato. Las secuencias corregidas de los cADN del gen PK-LR fue alineada con la secuencia derivada de las estructuras PK-M utilizando el programa “Alignment of Multiple Protein Sequences” (AMPS) (40). Los programas utilizados en el estudio de la estructura, la localización de las mutaciones y los efectos locales de las sustituciones fueron el RasMolv.2.6 y el Swiss Model

(SwissPdbViewerv.3.1).

### **Resultados y Discusión**

*Manifestaciones clínicas de pacientes defectivos en piruvato quinasa.* En la Tabla 1 se muestran los datos hematológicos y las observaciones clínicas de 10 pacientes con anemia hemolítica de edades comprendidas entre los 7 y 59 años. Se puede observar en todos los pacientes un aumento del número de reticulocitos y una disminución (excepto en el nº4) de la concentración de hemoglobina respecto a los niveles normales. Por otra parte, en todos los casos en que se ha determinado, los valores del índice de distribución estándar del volumen corpuscular (IDH) de los eritrocitos se encuentran dentro de los normales o son ligeramente superiores. Una disminución de la masa de hemoglobina circulante es un índice claro de anemia. El aumento de la cifra de reticulocitos permite clasificar la anemia de carácter regenerativo de tipo hemolítico, ya que este aumento es debido al aumento de la capacidad eritropoyética como consecuencia del acortamiento de la vida media de los eritrocitos. El hecho de que los valores de IDH estén dentro o próximos a la normalidad indica una población eritroide homogénea con ausencia de anisocitosis. El examen conjunto de los datos anteriores permite tipificar a los pacientes como portadores de una anemia hemolítica no esferocítica. Además, como los valores de la actividad piruvato quinasa de todos los pacientes son sensiblemente inferiores a los normales, se puede diagnosticar, de manera previa, que la anemia es consecuencia de una deficiencia en la enzima piruvato quinasa.

Los análisis realizados están basados en los métodos recomendados por la ICSH para la caracterización de pacientes con deficiencia en piruvato quinasa (41). La aplicación de estos métodos ha permitido identificar más de cuatrocientas variantes en dicha enzimopatía (27). Sin embargo, no existe una relación directa entre los datos hematológicos y las manifestaciones clínicas observadas. Así, los pacientes que muestra menor actividad piruvato quinasa en sangre (nº 3, nº 4 y nº 9) no son los que presentan los síntomas más

graves de anemia, ni tampoco el que mayor actividad tiene (nº 8) los síntomas más leves. Estos datos están de acuerdo con los obtenidos por otros investigadores (42, 43, 44) y demuestran la poca correlación que existe entre la gravedad de la anemia y el nivel de actividad de la enzima en las pruebas *in vitro*. Estas discrepancias se han intentado explicar como consecuencia de las diferentes propiedades químico-físicas y catalíticas que poseen las variantes deficientes en piruvato quinasa (7, 8), aunque muy posiblemente estén también relacionadas con el carácter recesivo de la enfermedad y la usual presentación de las mutaciones como dobles heterocigotos.

El defecto piruvato quinasa es el más frecuente de las anemias hemolíticas por deficiencia enzimática en los eritrocitos en Europa (45, 46, 47). El defecto aparece en todo tipo de poblaciones y se suele acompañar de ictericia y esplenomegalia (25, 45, 48, 49, 50). En España, en un estudio realizado en 1979 por García y col. (51) se encontró que la frecuencia con que aparece la deficiencia piruvato quinasa es del 0,24%.

Según se observa en la Tabla 1 el intervalo de manifestaciones de la anemia hemolítica es amplio e implica desde anemias severas que requieren esplenectomía y transfusiones de sangre ocasionales hasta estados hemolíticos compensados. En tres de ellos la anemia es de carácter leve y se presenta en un estado hemolítico compensado. En este grado la anemia no suele exacerbarse a lo largo de la vida si excluimos los episodios de hipoplasia eritroide debidos a infecciones como parvovirus B-19 y a mujeres en gestación (7, 8, 52).

**Tabla 1. Datos hematológicos y clínicos de pacientes defectivos en piruvato quinasa con anemia hemolítica no esferocítica**

Paciente n°	Edad (años)	Sexo	Hb (g/dL)	Reticulocitos (x 10 <sup>3</sup> /μL)	IDH* (%)	Actividad PK (U.I./g Hb)	Observaciones clínicas
1	30	V	10, 8	868	N.D.	4, ,6	Anemia crónica. Ictericia. Esplenectomía
2	16	H	9, 9	318	N.D.	2, 1	Anemia crónica. Ictericia
3	39	H	11, 2	150	N.D.	1, 9	Estado hemolítico compensado
4	35	V	13, 3	90	N.D.	1,9	Estado hemolítico compensado
5	7	V	10, 5	150	15, 9	4, 3	Estado hemolítico compensado. Ictericia
6	44	V	11. 5	144	15, 4	1, 8	Anemia crónica
7	-	H	10, 9	N.D.	12, 6	5,21	Anemia crónica
8	30	V	9, 4	2340	15,3	6, 8	Anemia crónica. Ictericia.

9	24	H	11, 2	316	13,1	1,4	Anemia crónica
10	59	V	11, 6	210	13,8	2, 0	Anemia crónica
<b>Valores normales</b>			12 -- 17	10 -- 20	11-15	12, 0 – 14, 0	

\*Índice de la distribución estándar del volumen corpuscular de los eritrocitos

Cuando se obtuvieron los datos hematológicos de los familiares mas cercanos de los pacientes correspondientes a la Tabla 1 se observó que los valores de la concentración de hemoglobina se encontraban dentro de los límites considerados normales lo cual es un índice de la ausencia de anemia. Es evidente que el producto del alelo normal es suficiente para proporcionar unos niveles fisiológicos normales respecto a la actividad piruvato quinasa.

*Caracterización molecular de pacientes con deficiencia en piruvato quinasa.* La identificación bioquímica de pacientes con deficiencia en piruvato quinasa mediante análisis enzimáticos se ve dificultada por la frecuencia relativamente alta de personas heterocigotas que portan enzimas híbridas con propiedades diferentes y por las transfusiones. Estas particularidades nos ha llevado a estudiar la enzimopatía piruvato quinasa a nivel molecular puesto que es lógico pensar que anomalías fisiológicas observadas sean consecuencia de defectos en la molécula de ADN.

En la Tabla 2 se recogen las diferentes mutaciones encontradas en el gen PK-LR y que son causadas por la sustitución de un nucleótido. Todos los pacientes son heterocigotos compuestos o dobles y solo uno (nº 10) muestra las mutaciones en el mismo exón. La mutación G1529A (Arg  $\Rightarrow$  Gln), que es, junto con la C1456T, la más frecuente en el Norte y Centro de Europa (25, 45) ha sido encontrada solamente una vez en nuestro estudio. En tres de los pacientes (nº 2, nº 5 y nº 8) no se encontró un segundo alelo con mutación, pero presentan claros síntomas de anemia, lo que induce a pensar que la segunda mutación se debe encontrar en las regiones reguladoras del gen PK-LR.

Tabla 2. Características genéticas de pacientes con deficiencia en piruvato quinasa				
Paciente nº	Exón nº	Posición alelo 1 alelo 2	Mutación alelo 1	Substitución aminoacídica
1	8	1150	ACG ⇒ GCG	Thr ⇒ Ala
	10	1529	CGA ⇒ CAA	Arg ⇒ Gln
2	7	993	GAC ⇒ GAA	Asp ⇒ Glu
3	6	721	GAG ⇒ TAG	Glu ⇒ Stop
	10	1456	CGG ⇒ TGG	Arg ⇒ Trp
4	6	721	GAG ⇒ TAG	Glu ⇒ Stop
	10	1456	CGG ⇒ TGG	Arg ⇒ Trp
5	8	1175	GCC ⇒ ACC	Ala ⇒ Thr
6	10	1456	CGG ⇒ TGG	Arg ⇒ Trp
	11	1675	CGA ⇒ TGA	Arg ⇒ Stop
7	8	1154	AGG ⇒ AAG	Arg ⇒ Lys
	10	1492	CGG ⇒ TGG	Arg ⇒ Cys

8	6	721	<b>GAG ⇒ TAG</b>	<b>Glu ⇒ Stop</b>
9	5 10	694 1456	<b>AGC ⇒ GGC</b> <b>CGG ⇒ TGG</b>	<b>Ser ⇒ Gly</b> <b>Arg ⇒ Trp</b>
10	6 6	721 821	<b>GAG ⇒ TAG</b> <b>GGG ⇒ CGG</b>	<b>Glu ⇒ Stop</b> <b>Gly ⇒ Arg</b>

En los pacientes en que se ha encontrado mutaciones sustitutivas en los dos alelos se ha observado que los valores de la actividad piruvato quinasa encontrados en sangre son, en la mayoría, notablemente inferiores a los normales. Sin embargo, el cuadro anémico observado abarca un amplio espectro y es similar al descrito por Lenzner y col. (25) en estudios con pacientes defectivos en piruvato quinasa. Es lógico llegar a la conclusión de que no existe relación entre los datos moleculares obtenidos y la severidad de la enfermedad. Sin embargo, en este estudio como excepción a esta regla, hemos encontrado dos pacientes (nº 3 y nº 4) que tienen las mismas mutaciones sustitutivas y similar grado de anemia hemolítica. Claro que en este caso, los dos pacientes son hermanos y a la similitud de la expresión de los genes debe asociarse la semejanza del resto de factores que intervienen en la manifestaciones clínicas de la enfermedad.

*Distribución de la frecuencia de las mutaciones en piruvato quinasa.* Cuando se representa la frecuencia de las 17 mutaciones correspondientes a los 10 pacientes deficientes en piruvato quinasa que cursan con anemia hemolítica no esferocítica en un histograma. Se puede observar que las

mutaciones más frecuentes son la C1456T y la G721T, mutaciones sustitutivas que aparecen en el 23,5% de los cromosomas mutados. La mutación C1456T aparece en todos los casos con una segunda mutación en un estado heterocigoto compuesto. La mutación C1456T es la que también con mayor frecuencia se ha encontrado en otros trabajos similares realizados en España (50), Italia (42) y Chequia/Eslovaquia (25) y la segunda en frecuencia encontrada en pacientes de Inglaterra, Alemania y Estados Unidos (25, 36, 45, 53).

La mutación G721T aparece también con una frecuencia de 23,5% (4 de los 17 alelos mutados); es una mutación de naturaleza sin sentido que conduce a un codón de terminación de cadena. La G721T es la segunda mutación más frecuente encontrada en pacientes de España y Francia (50, 54) y la tercera más frecuente en Italia y Estados Unidos (42, 49, 45, 55). La mutación no ha sido encontrada en pacientes procedentes de Alemania, Inglaterra y Chequia/Eslovaquia ni en Japón y China, donde la mutación que predomina es la C1468T (56, 57, 58) que, por otra parte no ha sido descrita en los países de Europa.

El resto de las mutaciones, 9 alelos de 17 (53%) son todas diferentes, lo que indica la gran variabilidad genética de las deficiencias piruvato quinasa. Tres de estas mutaciones, G694A, A1150G y G1154A, son descritas por primera vez. Se puede deducir que las mutaciones en el gen PK que conducen a una deficiencia piruvato quinasa están muy distribuidas a lo largo del planeta. Quizás la única generalización que resulta de este hecho es que en Europa la mutación que predomina en el Norte es la G1529A en el Sur la más frecuente es la C1456T (25, 36, 46, 47, 50, 54, 55, 59). Las diferencias regionales y étnicas que se han podido observar respecto a las mutaciones PK sugieren que la mayoría de estas no pueden ser muy antiguas, al menos, mucho más recientes que la separación de los grupos étnicos entre Europa y el Este asiático.

*Herencia genética de las deficiencias piruvato quinasa: Genealogías.* Los análisis del ARN mediante PCR demostraron que todos los alelos se expresa-

ron con normalidad. Se puede fácilmente constatar el carácter hereditario de las mutaciones que originan deficiencias piruvato quinasa. El paciente nº 1 es heterocigoto compuesto con dos mutaciones que se localizan en la posición 1150 que hereda del padre y la 1529 que hereda de la madre. Los pacientes nº3 y nº 4 son hermanos y ambos, heterocigotos compuestos, heredan la mutación 721 del padre y 1456 de la madre. El paciente nº 6 es portador de dos mutaciones, la 1456 que hereda de la madre y la 1675, que toda probabilidad procede del padre, del que no se tienen datos por fallecimiento. El paciente transfiere uno de sus alelos mutados a su hijo y el otro a su hija. El paciente nº 7 hereda la mutación 1492 del padre y la 1154 de la madre, es por lo tanto un heterocigoto compuesto. El paciente nº 9 también es un heterocigoto compuesto con un alelo mutado que procede de la madre y otro que presumiblemente procede de la madre.

*Localización de las mutaciones en los exones y en las regiones del gen piruvato quinasa.* En la Tabla 2 también se ha mostrado la localización de las mutaciones encontradas en el gen PK de eritrocitos humanos. Se puede observar que las diecisiete mutaciones obtenidas se encuentran entre los exones nº 5 y nº 11. De ellas seis se localizan en el exón nº 10 (35,5%) y cinco en el exón nº 6 (29,4%). Solamente se ha encontrada una en el exón nº 5, otra en el nº 7 y una tercera en el nº 11. Cuando se compara la frecuencia de la localización de las mutaciones en los exones asociadas a una deficiencia en piruvato quinasa descritas en España con las encontradas en Europa y en América y el Lejano Oriente, se puede comprobar que las mutaciones se encuentran desigualmente distribuidas a lo largo de la región codificante. Ninguna mutación ha sido detectada en el exón nº 1 que es específico de la isozima PK-R de eritrocito y que corresponde a la región reguladora del gen y solamente se ha encontrado una en el exón nº 2 (60).

También se pudo observar que, de forma general, las mutaciones aumentan progresivamente desde los primeros exones concentrándose el mayor número de ellas entre los exones nº 6 y nº 10 inclusive. En España los exones en donde se encuentra con mayor frecuencia mutaciones son el nº 7 y el nº 10

los mismos que en las mutaciones descritas en Estados Unidos. Contrasta notablemente el bajo número de mutaciones descritas en el exón nº 9 en los países europeos con los descritos en los exones adyacentes; este hecho no puede tener su base en la mayor probabilidad por el tamaño de los exones ya que el nº 9 (153 nucleótidos) es más de dos veces mayor que el nº 8 (66 nucleótidos).

*Comparación de las secuencias aminoacídicas de diferentes especies.* Cuando se comparan las secuencias aminoacídicas de las regiones en que aparecen las mutaciones de piruvato quinasa de eritrocitos humanos con las de, también de eritrocitos, ratón, rata y perro, las de músculo de gato, conejo, gallo y sapo, las de mosca y gusano y las de levadura (*Saccharomices cerevisiae*) y de *Escherichia coli*. Esta última es la más alejada de la especie humana de las que se conoce su estructura primaria. En *E.coli* han sido caracterizados bioquímicamente y genéticamente dos isozimas (I y II) con actividad piruvato quinasa (10, 12). La isozima I es sensible a la activación por fructosa 1,6-bisfosfato y, curiosamente, tiene unas propiedades cinéticas y reguladoras semejantes a las de los eritrocitos humanos.

El cambio Gly232→Ser, que corresponde a la mutación G694A, se encuentra en una posición conservada en los animales vertebrados salvo en el perro (61), pero flanqueada por secuencias de aminoácidos muy variables. Este hecho y el que el cambio producido sea a serina, que es el aminoácido que aparece en las secuencias de PK de otras especies como en la de gusano, hace pensar que la mutación no debe alterar significativamente la funcionalidad de la enzima. La mutación G821C origina el cambio de dos aminoácidos con un tamaño y propiedades químicas diferentes (Gly275 →Arg) y en una posición muy conservada en todas las especies incluidas las bacterias. Es previsible por tanto que el cambio afecte, de forma esencial, a la estructura tridimensional de la enzima.

La mutación G821C produce la sustitución de Asp331→Arg, esto es, de dos aminoácidos con cargas opuestas y en una posición y región muy conservadas en todas las especies. Además, el cambio está muy próximo a la

secuencia MVARGDL donde se encuentra el Asp339 uno de los ligandos a los que se une el  $Mn^{2+}$  (35), y por el que, como se sabe, la enzima tiene un requerimiento absoluto. Es lógico pensar que el cambio altere la actividad de la enzima. Las mutaciones A1150G, G1154A y G1174A originan los cambios sustitutivos de Thr384→Ala, Arg385→Lys y Ala392→Thr, respectivamente, en posiciones y en una región extraordinariamente conservados. Esta región se encuentra entre los aminoácidos Thr371, Gln372 y Glu406 los cuales participan en el proceso catalítico activamente. Así, en el transcurso del mismo, los dos sustratos de la enzima, PEP y ADP, se unen al  $K^+$ , el cual a su vez se enlaza a la Gln372 y al Glu406. (33). Por su parte el Thr371 junto con la Lys313 posicionan y orientan el PEP en el centro activo (35). Por ello, es razonable que la sustitución aminoacídica en cualquiera de las tres posiciones conlleve graves consecuencias en el proceso catalítico.

Las mutaciones C1456T, C1492T y G1529A que originan los cambios Arg486→Trp, Arg498→Trp y Arg510→Gln, respectivamente, se encuentran relativamente próximos en la secuencia aminoacídica de la enzima. Van Solinge y col. (62) sugieren que la arginina en la posición 486 forma enlaces de hidrógeno con otros residuos aminoacídicos adyacentes en la estructura terciaria y que su sustitución ocasionaría graves alteraciones en la misma. Sin embargo, la posición no se encuentra bien conservada y en la de rata, cuya homología con la de humana es más del 99%, se encuentra sustituida por la glutamina, por ello no es lógico pensar que las conformaciones de esas dos enzimas sean muy diferentes. Lo mismo se podría argumentar en la sustitución de la arginina en la posición 498, pero además en este caso como veremos más adelante, el aminoácido se encuentra alejado del centro activo y otros aminoácidos con los que potencialmente pudiera formar enlaces de hidrógeno, por lo que no parece que este cambio pudiera alterar significativamente la estructura terciaria de la enzima.

La sustitución de glutamina por arginina en la posición 510 ha sido bien estudiada por Van Solinge y col. (63). Según estos investigadores la sustitución conduce a la formación de un nuevo enlace de hidrógeno que no aparece

en la enzima normal. Este hecho junto con el que la arginina se encuentra muy bien conservada en todas las especies induce a pensar que el cambio produce una importante alteración en la conformación de la piruvato quinasa.

*Las sustituciones aminoacídicas y sus efectos en la actividad piruvato quinasa.* Una primera aproximación a la relación estructura  $\Rightarrow$  función debería obtenerse del examen de las propiedades químicas de los aminoácidos que se intercambian en la secuencia aminoacídica de la proteína. Podría esperarse que las sustituciones de aminoácidos con propiedades químico-físicas mas diferentes podrían alterar en mayor medida la conformación de la enzima disminuyendo notablemente su actividad y provocando una mayor alteración fisiopatológica que cursaría con una manifestación mas severa de anemia hemolítica. Naturalmente, a dichos cambios hay que agregar los que conducen a una terminación prematura de la cadena polipeptídica. Siguiendo con esta pauta es lógico pensar que el cambio de un aminoácido polar con carga por otro con carga de sentido contrario originaría una alteración notable en la estructura de la enzima que se correspondería con un mayor descenso de la actividad y con una manifestación de tipo mas grave de anemia. Sin embargo, este razonamiento no siempre se cumple y, así, el cambio conservativo Asp  $\Rightarrow$  Glu que conlleva la piruvato quinasa del paciente n° 2 y que, debido a que la naturaleza química de los dos aminoácidos es semejante, se podía esperar una actividad enzimática similar a la de la normal y, como mucho, un estado hemolítico compensado. Sin embargo, la actividad enzimática es más de seis veces menor que la de la enzima normal y la deficiencia cursa con anemia hemolítica crónica. Lo que hasta ahora parece evidente es que los casos mas severos de anemia correlacionan con una pérdida significativa de la actividad enzimática y con un proceso de degradación complejo debido a la rápida eliminación de los péptidos inestables como consecuencia de la modificación de la estructura de la enzima. Lenzner y col. (59), señalan que la actividad piruvato quinasa en los eritrocitos depende, al menos, de dos factores: un factor constante, que es en esencia la mutación que origina una enzima con actividad reducida y/o estabilidad alterada, y un factor variable, que se basa en la actividad proteolítica

intracelular. Sin embargo, no deben dejarse de lado otros factores que aunque su influencia sea bastante menor son capaces de marcar diferencias en las manifestaciones clínicas incluso entre parientes próximos, como pueden ser padres e hijos o hermanos.

Podría resumirse que la situación de deficiencia piruvato quinasa es parecida a la que tiene lugar otros pacientes con otras enzimopatías o desordenes genéticos (63, 64). Y es que además del genotipo, los factores bioquímicos y fisiológicos del entorno juegan un papel clave en el grado de severidad de la enfermedad. Este hecho se pone de manifiesto en ocasiones en que pacientes, que son parientes próximos, con el mismo genotipo piruvato quinasa tienen unas manifestaciones clínicas parecidas de la enfermedad. Así, los pacientes nº 3 y nº 4 son hermanos, sus características genéticas respecto a la piruvato quinasa son idénticas, la actividad de las enzimas son iguales y el grado de severidad de las anemias hemolíticas similares.

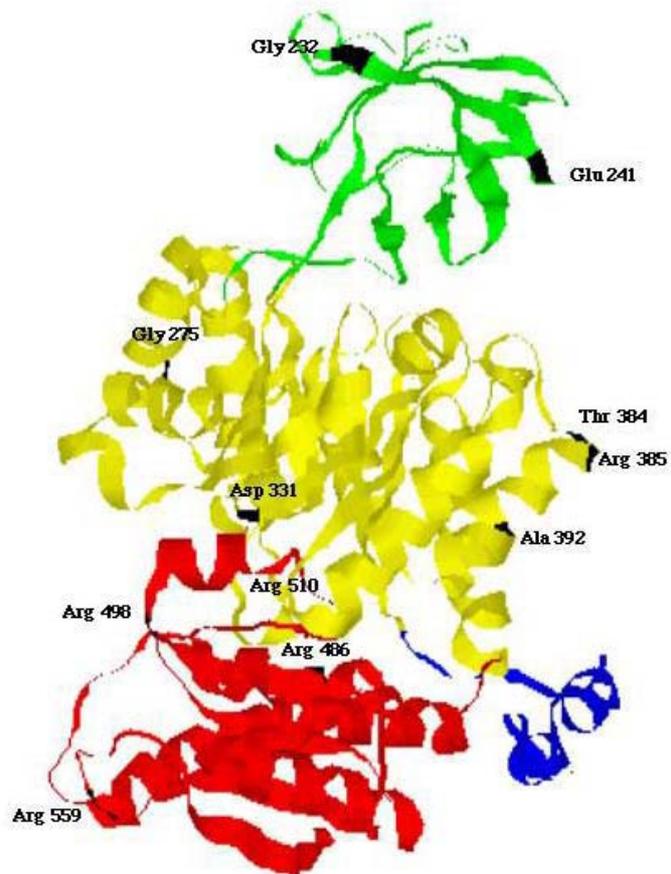
*Efectos de las mutaciones sobre la estructura de la piruvato quinasa: Modelos moleculares.* El conocimiento de la posición de las mutaciones piruvato quinasa en la secuencia aminoacídica junto con el análisis de la estructura cristalina y los efectos que producen en la conformación de la enzima puede ayudarnos a entender la pérdida de actividad de la enzima y predecir o, al menos, aproximarnos al entendimiento de alguno de los procesos que ocasionan las alteraciones clínicas en las deficiencias enzimáticas.

El progreso en el conocimiento de la estructura de la enzima PK ha sido posible gracias a los análisis de difracción de rayos X de las piruvato quinasa cristalizadas de músculo de gato (34) y de conejo (35) y que han sido resueltas con resoluciones de 2,6 y 2,9 Å, respectivamente. Se ha podido comprobar que la PK-M<sub>1</sub> de músculo de conejo y de gato muestran una homología muy significativa con la PK-R de eritrocitos humanos.

El estudio de las estructuras tridimensionales de las piruvato quinasa de músculo de conejo y de gato ha permitido conocer los sitios de unión de los

substratos, de los cationes esenciales y de los efectores y el mecanismo del proceso enzimático. También ha servido para predecir las modificaciones que sufre la estructura molecular de las enzimas debido a los cambios que originan la sustitución de un aminoácido por otro como consecuencia de una mutación. Siguiendo este criterio es lógico pensar que las sustituciones de los residuos aminoacídicos que se localicen próximos a los sitios de unión de los sustratos, o de unión de los cationes, tengan graves efectos ya que los cambios eléctricos y/o conformacionales que se originan en esas áreas directamente implicadas en la catálisis, llevan asociados acusados descensos de la actividad enzimática que se traducen, muy posiblemente, en alteraciones hematológicas y clínicas graves.

Se ha podido comprobar que en cada subunidad de la PK se diferencian cuatro dominios, N, A, B y C (Fig. 2), formados por cadenas unidas por segmentos polipeptídicos flexibles con una función o funciones determinadas (34, 35).



La mutación Gly 232 a Ser se localiza en el dominio B en una región molecularmente poco densa y a la que hasta ahora no se adscrito una función específica en la catálisis por lo que no es de esperar que la sustitución aminoacídica altere de forma importante la actividad enzimática. Sin embargo, el nivel de la actividad enzimática de la piruvato quinasa en sangre del paciente 9, que es el portador de la mutación, es muy bajo, cerca de la décima parte del valor normal. Podía pensarse que esta región contiene alguna estructura o sitio donde se fije algún regulador o que participe en los estados de transición de la enzima. Sin embargo el lugar donde se localiza el sitio de unión del activador más efectivo, la fructosa 1,6-bisfosfato, se encuentra en el dominio C (36, 65) y, se ha demostrado, que el dominio B es el más alejado del área de contacto entre las subunidades (33, 34). Aunque todavía no se ha asignado ninguna función determinada al dominio B en el contexto general del proceso catalítico su papel debe ser importante ya que una sustitución aminoacídica del tipo Gly→Ser origina una pérdida considerable de la actividad enzimática. Lo único cierto es que la sustitución aminoacídica origina un fuerte impedimento estérico del residuo de la Ser con el de Phe 235 que podría alterar notablemente la estructura terciaria en esa región y transmitirse al resto de la molécula (Fig. 3 A y B). Otra posibilidad lógica es que esa región constituya uno de los determinantes intrínsecos de la proteína. Se sabe que la conformación correcta de una proteína se origina casi simultáneamente a su síntesis y en un tiempo real infinitamente menor que el calculado por medidas químico-físicas. La clave de esta diferencia, conocida como paradoja de Levintal, se encuentra en que en el proceso de plegamiento se forman y conservan fragmentos o determinantes intrínsecos que sirven de centros o ejes de apoyo sobre los que se forma el correcto plegamiento de la proteína. Una alteración, por pequeña que sea, en esa región podría suponer un plegamiento imperfecto que implicaría a la totalidad de la conformación de la enzima.

La mutación G821C origina la sustitución en la posición 275 de un residuo aminoacídico de pequeño tamaño como es Gly por otro de tamaño considerablemente mayor como la Arg. Podía esperarse por tanto una alteración en la estructura de la hélice A $\alpha$ 3 simplemente por efecto estérico. A este hecho debe añadirse la proximidad del residuo Asp 277 que debe originar una atracción electrostática muy fuerte con el de Arg (Fig. 3, C y D) lo cual limitaría la movilidad de la cadena lateral de este aminoácido impidiéndole ocupar una posición estable y, por consiguiente, rompiendo la conformación de la proteína en esa región. Por otra parte, la posición 275 se encuentra relativamente próxima a la de los residuos Ser 286 y Phe 287 que intervienen directamente en la estructura del centro activo. Por ello es fácilmente predecible que la actividad de la PK se encuentre disminuida como así se puede observar en los análisis enzimáticos realizados en la sangre del paciente 10 que es el portador de la mutación G821C.

La mutación C993A ocasiona el cambio Asp→Glu en la posición 331 de la estructura primaria de la PK (Fig. 3, E y F). En la enzima normal el residuo de Asp se encuentra unido mediante dos enlaces de hidrógeno con el de Ile 310 y con un puente salino con la Lys 365, debido a la proximidad del grupo amino de la cadena lateral de este residuo (3,07Å) (35). En la sustitución del Asp por el Glu se rompe un enlace de hidrógeno pero permanece la distancia entre los grupos distintamente cargados lo que hace suponer que la fuerza del puente salino permanece intacta. La región en que se encuentra la mutación está situada entre la A $\alpha$ 5 y la lámina A $\beta$ 6 una región espaciosa, pero la posición 331 se encuentra en la hendidura del centro activo y muy próxima al residuo Asp 339 que interviene directamente en el proceso catalítico. El paciente nº 2 es el portador de la mutación C993A que produce esta sustitución y la actividad de la PK en sangre es considerablemente menor que en la de individuos normales.

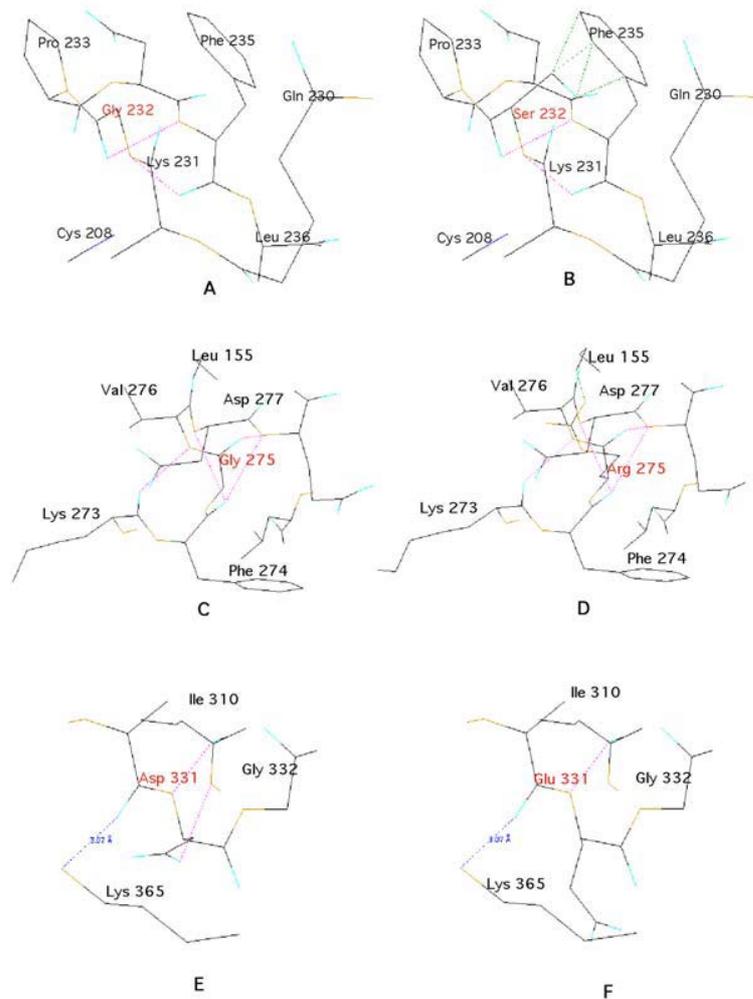


Figura 3. Estructura de las regiones próximas a los aminoácidos sustituidos correspondientes a las mutaciones G694A (A y B), G821C (C y D) y C993A (E y F). Los aminoácidos implicados en el cambio y la posición en la secuencia aminoacídica se muestran en color rojo

La mutación A1150G produce el cambio de Thr por Ala en la posición 384. La Thr se encuentra entre la Pro 383 y la Arg 385 en una zona inmediata a la hélice A $\alpha$ 7. La sustitución por Ala debe modificar la posición de dicha hélice respecto a las otras estructuras adyacentes del dominio A condicionando a su vez la posición del Glu 387 al que está unido por un enlace de hidrógeno y a la Gly 388 que interviene directamente en la conformación del centro activo (Fig. 4, A y B). Por ello se debe esperar que la actividad de la enzima se encuentre disminuida respecto a la normal. Este hecho se puede contrastar en la Tabla 1 donde el nivel de la actividad de la PK en sangre del paciente n° 1, que es portador de la mutación, es bastante menor que el de la sangre de individuos normales.

La mutación G1154A causa, en la posición 385 el cambio de Arg por Lys dos aminoácidos polares con carga positiva a pH fisiológico. El cambio se localiza en el inicio de la hélice A $\alpha$ 7 y en una región aparentemente, sin ninguna relación con otras estructuras de la enzima. Podría esperarse una atracción electrostática entre los grupos cargados de la Lys y el Glu 387; sin embargo, la orientación en la estructura proteica mantiene estos grupos alejados. Después de la sustitución, la distancia del grupo amino a la Pro 383 pasa de 3,74 a 9,45 Å (Fig. 4, C y D). Por ello, la posible alteración que pueda sufrir la conformación en esta región, por otra parte poco densa molecularmente, no debe influir de forma significativa en las regiones esenciales de la enzima para disminuir su capacidad catalítica.

La mutación G1174A origina el cambio de aminoácidos Ala→Thr en la posición 392. En la enzima normal la Ala se encuentra unida por tres enlaces de hidrógeno con la Val 395, Leu 396 y Ser 389 y en la enzima mutada aunque desaparece el de Ser 389 se forma uno nuevo con la Ile 424. (Fig. 4, E y F) La sustitución no parece alterar la conformación de la enzima de forma esencial, ya que además de que el tamaño de los aminoácidos es

similar, la estructura de la hélice  $\alpha$  se mantiene compacta en una región relativamente distante del área de interconexión de los dominios A y C en la que se encuentra el centro activo (fig.2). Los datos hematológicos del paciente nº 5, que es portador de esta mutación, no varían significativamente respecto a los normales y el estado del paciente es del tipo hemolítico compensado.

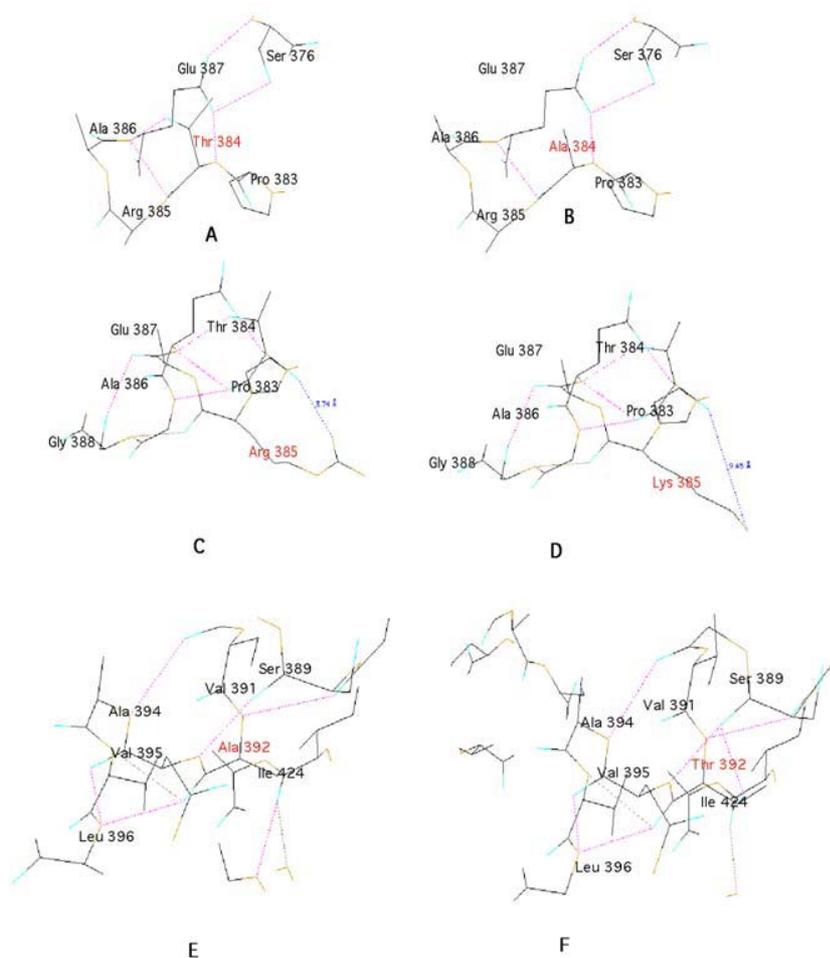


Figura 4. Estructura de las regiones próximas a los aminoácidos sustituidos correspondientes a las mutaciones A1150G (A y B), G1145A (C y D) y G1174A (E y F). Los aminoácidos implicados en el cambio y la posición en la secuencia aminoacídica se muestran en color rojo.

La mutación C1456T origina el cambio de Arg→Trp en la posición 486 localizada en la hélice 3 $\alpha$  del dominio C. La Arg forma un enlace de hidrógeno con la Gln 483 y otro con la His 482. La sustitución por Trp rompe el enlace con la Gln pero mantiene el de His (Fig. 5, A y B). De la diferencia de tamaño entre los dos residuos aminoacídicos puede esperarse una ruptura de la conformación de la hélice  $\alpha$  y aunque la región es espaciosa se encuentra en la zona de interconexión entre los dominios A y C, de gran importancia ya que además de estar próxima al centro activo se encuentra el sitio de unión para el efector fructosa 1,6-bisfosfato (65). La inserción de este aminoácido de gran tamaño debe provocar, por tanto, efectos perjudiciales en la estructura de esta zona esencial para la actividad y regulación de la enzima. Estas alteraciones se ven reflejadas en que la actividad de la PK de la sangre de los pacientes 3 y 4, que son portadores de dicha mutación, es muy baja comparada con la PK normal.

La mutación C1492T causa el cambio Arg →Cys en la posición 498 de la secuencia aminoacídica de la proteína. En la enzima normal la Arg está unida con 5 enlaces de hidrógeno a cuatro aminoácidos vecinos (Glu 476, Asp 519, Pro 520 y Asp 528) (Fig. 5, C y D ) lo que debe proporcionar a esta pequeña región de sólo tres aminoácidos sin estructura secundaria, y comprendida entre la lámina C $\beta$ 2 y la hélice C $\alpha$ 4, una estructura relativamente rígida. La sustitución por Cys ocasiona la desaparición de 4 enlaces de hidrógeno, manteniéndose el del Glu 476 y formándose uno nuevo con la Cys 517, muy próxima a la posición 498. Esta proximidad hace suponer que, a pH fisiológico, se forme un puente disulfuro entre los dos residuos cisteínicos. Sin embargo dicha distancia, aunque pequeña, 5,73 Å, no parece lo suficiente para que los dos grupos SH reaccionen entre sí y la inserción de una Cys no parece implicar la formación de un enlace covalente –S-S-. La desaparición

de neta de tres enlaces de hidrógeno debe permitir mayor movilidad a C $\beta$ 2 y C $\alpha$  (Fig.2), pero las nuevas posiciones que tomen en el espacio estas estructuras no deben ocasionar alteraciones importantes a la estructura terciaria de la enzima que afecten a su actividad catalítica.

La mutación G1529A produce el cambio de Arg→Gln en la posición 510. En la enzima normal la Arg forma un enlace de hidrógeno con la Ala 399 y otro con la Arg 488. Por otra parte la Thr 88 se encuentra en una posición muy próxima (4,2 Å) y como proponen Van Solingen y col. (63) debe existir un puente salino con la Arg 510. La sustitución por Gln aunque crea un nuevo enlace con el Asp 400 desaparece el de la Ala, la cadena lateral se pliega sobre si misma y la distancia con la Thr se incrementa mas del doble desapareciendo o, al menos, reduciéndose la atracción electrostática entre los grupos opuestamente cargados (Fig. 5, E y F). Estos hechos favorecen la libre conformación entre los dominios A y C, alterando la conformación de la proteína entre dichos dominios en una región que participa directamente en la unión con otras subunidades y con los efectores de la enzima. Como la transición desde el estado T (baja afinidad) al R (alta afinidad) requiere rotación de las 4 subunidades del tetrámero mediante goznes o bisagras flexibles, la formación y/o escisión de los puntos de contacto entre las subunidades podría enlentecer o interrumpir la respuesta de los efectores y con ello alterar la actividad y/o la regulación de la enzima.

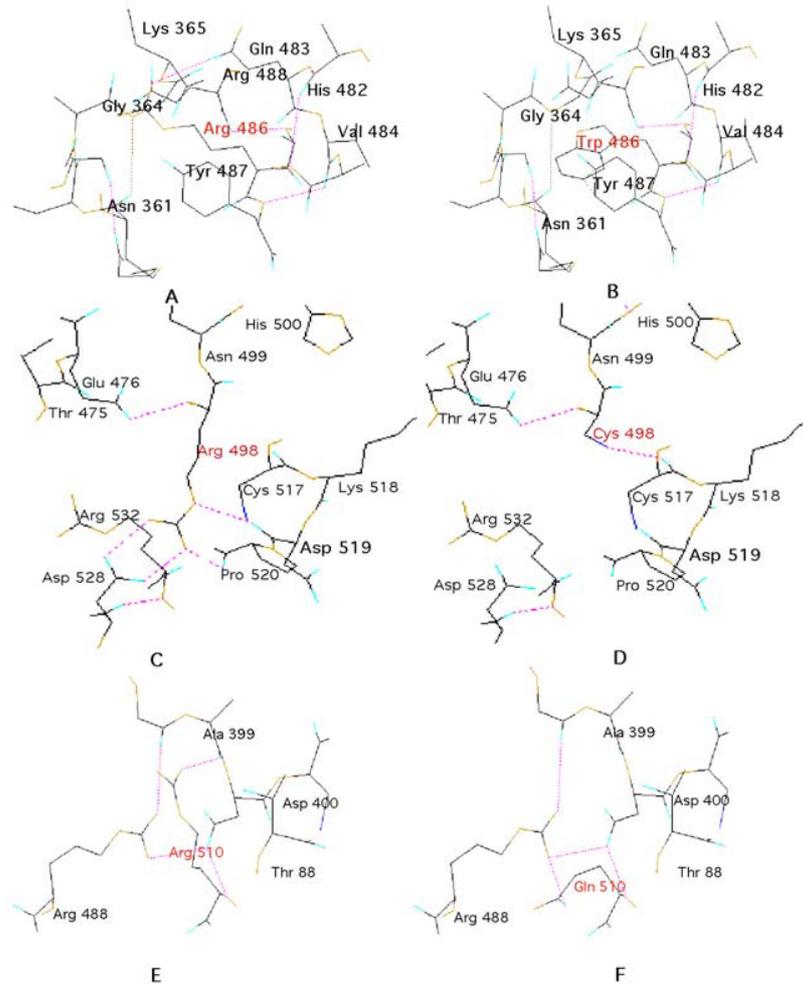


Figura 5. Estructura de las regiones próximas a los aminoácidos sustituidos correspondientes a las mutaciones C1456T (A y B), C1492T (C y D) y G1529A (E y F). Los aminoácidos implicados en el cambio y las posiciones en la secuencia aminoacídica se muestran en color rojo.

### Bibliografía

- (1) BREWER G.J. (1980) *Med. Clin. North. Am.* **64**: 579-596.
- (2) BREWER, G.J. (1984) *Red Cell Metabolism and Function*, 3th ed., Plenum Press, NewYork.
- (3) BEUTLER, E. (1986) *Red Cell Metabolism. Methods in Hematology*, vol. 16, Churchill Livingstone. Edimburg.
- (4) LUQUE J., PINILLA M. ESCRIVÁ F. Y GIMÉNEZ A. (1991) *Bioquímica*. Vol. II. 2ª Ed. Herrera E., Interamericana McGraw-Hill.
- (5) YOSHIKAWA,H. AND RAPOPORT, S. M. (1974) *Cellular and Molecular Biology of Erythrocytes*. Medical and Technical Publications Co., London.
- (6) PERUTZ, M. F. (1990) *Ann. Rev. Physiol.* **52**: 1-25.
- (7) GILSANZ F. (1996) *Anemia: manifestaciones clínicas y clasificación*. Medicine. 7ª Serie. IDEPSA. Madrid. pp. 1169-1171.
- (8) GILSANZ F. (1996) *Anemia: manifestaciones clínicas y clasificación*. En: Medicine. 7ª Serie. IDEPSA. Madrid. pp. 1213-1216.
- (9) ZEREZ C. R. AND WEISS R. L. (1987) *Blood* **4**: 999-1005.
- (10) GARRIDO-PERTIERRA A. AND COOPER R. A. (1977) *J. Bacteriol.* **129**: 1208-1214.
- (11) GARCÍA-OLALLA C. AND GARRIDO-PERTIERRA A. (1987). *Biochem. J.* **241**: 573-581.
- (12) GARRIDO-PERTIERRA A. AND COOPER R.A. (1982) *FEBS* **162**: 420-422.
- (13) NOGUCHI T. YAMADA K. INOUE H. MATSUDA T. AND TANAKA T. (1987) *J. Biol. Chem.*: 14366-14371.
- (14) CONSLER T. G., WOODARD S. H. AND LEE J. C. (1989) *Biochemistry* **28**: 8756-8764.
- (15) MONOD J. CHANGEUX J. P AND JACOB J. (1963) *J. Mol. Biol.* **6**: 306-329.
- (16) IKEDA Y., TANAKA T. AND NOGUCHI T. (1997) *Journal of Biological Chemistry* **33**: 20495-20501.

- (17) TANI K., FUJII H. AND NAGATA S. (1988) *Pro. Natl. Acad. Sci. (USA)* **85**: 1792-1795.
- (18) TANI K., YOSHIDA M. C., SATOH H., MITAMURA K., NOGUCHI T. AND TANAKA, T. (1988). *Gene* **73**: 504-509.
- (19) KANNO H., FUJII H. AND MIWA S. (1994). *Blood* **84** (Suppl. 1), 13a.
- (20) KANNO H., MARIMOTO M., FUJII H., TSUJIMURA T., ASAI H., NOGUCHI T. KITAMURA Y AND MIWA S. (1995) *Blood* **86**: 3205-3209.
- (21) KAHN A. VIVES-CORRONS J. L., MARIE J. GALAND C. AND BOLVIN (1977). *Clin. Chim. Acta* **75**: 71-78.
- (22) VIVES-CORRONS J. L., MARIE J., PUJADES M .A. AND KAHN A. (1980). *Hum. Genet.* **53**: 401-408.
- (23) NEUBANER B., LAKONEK M., WINKER M., PARKE M. HOFFERBERT S. Y SCHRÖTER W. (1991). *Blood* **77**: 1871-1875.
- (24) KANNO H., FUJII H., WEI D. C., CHAN L. C., HIRONO A., TSUKIMOTO I. AND MIWA S. (1997). *Blood* **11**: 4213-4218.
- (25) LENZNER C. NÜRNBERG P., JACOBASCH G. GERTH C. AND THIELE B-J. (1997) *Blood* **89**: 1793-1799.
- (26) VALENTINE G., CHIARELL L.R. FORTIN R., DOLZAN M., GALIZZI A., ABRAHAM D.J. AND WANG C. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**: 23807-23814.
- (27) MARTINOV M. V., PLOTNIKOV A. G. AND ATAULLAKHANOV F. L. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* **1474**: 75-87.
- (28) JACOBACH G. AND RAPOPORT S. M. (1996). *Mol. Aspect.* **17**: 143-170.
- (29) DEMINA A., VARUGHESE K. I., BARBOT J. FORMAN L. AND BUETLER E. (1998) *Blood* **2**: 647-652.
- (30) TANAKA K. R. AND PAGLIA D. E. (1971) Pyruvate kinase deficiency. *Semin. Hematol.* **8**, 367-369.
- (31) TANAKA K. R. (1985) Current therapy in Hematology-Oncology. Brain M. C. and Carbone P. P. (eds). Philadelphia. USA.
- (32) BRANDEN C. AND TOOZE J. (1991) Introduction to Protein Structure. Garland Pub.Inc. New York.

- (33) MUIRHEAD H. GRANT J. P. LAWTON C. A. MIDWINTER J. C. NOCTON J. C. AND STUART D. I. (1981). *Biochem. Soc. Trans.* **9**: 212-213.
- (34) MUIRHEAD H., CLAYDEN D. A., BARFORD D., LORIMER C. G., FOTHERGILL-GILMORE L. A., SCHILTZ E. SCHMITT W. (1986). *EMBO J.* **5**: 475.
- (35) LARSEN T. M., LAUGHLIN L. T., HOLDEN H. M. RAYMET I. AND REED G. H. (1994) *J. Biochem.* **33**: 6301-6305.
- (36) MILLAR S.A., DYKES D.D. AND POLESKY H. F. (1988) *Nucleic Acids Res.* **16**:1215
- (37) SAMBROOK J., FRITSCH E.F. AND MANIATIS E. F. (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York
- (38) SANGER F., NICKLEN F. S. AND COULSON A. R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463-5467.
- (39) ALLEN Y MUIRHEAD (1998) *Acta Cryst D* **52**: 499-504
- (40) BARTON G. J. (1990). *Methods Enzymol.* **183**: 403-415.
- (41) MIWA S., BOIVIN P., BLUME K. G., ARNOLD H., BLACK J. A., KAHN A., STAAL G. E. J., NAKASHIMA K., TANAKA K. R. PAGLIA D. E., VALENTINE W. N. YOSHIDA A. AND BEUTLER E. (1979) *Br. J. Haematol.* **43**: 275-279.
- (42) ZANELLA A., BIANCHI P., BARONCIANI, L., ZAPPA, M., BREDI E., VERCELLATI C., ALFINITO F., PELISSERO G. AND SIRCHIA G. (1997) *Blood* **10**: 3847-3852.
- (43) MIWA S., KANNO H. AND FUJII H. (1993) *Am J. Hematol.* **42**: 31-35.
- (44) MIWA S. AND FUJII H. (1996) *American Journal of Hematology* **51**: 122-132.
- (45) BARONCIANI, L. AND BEUTLER E. (1993) *Pro. Nat. Acad. Sci. USA* **90**: 4324-4327.
- (46) BARONCIANI, L. AND BEUTLER E. (1995). *J. Clin. Invest.* **4**: 1702-1709.
- (47) BARONCIANI L., BIANCHI P. AND ZANELLA A. (1996b) *Blood Cells Mol Dis.* **22**: 259-264.
- (48) KANNO H., FUJII H., HIRONO A. OMINE M AND MIWA S (1992) *Blood* **79**: 1347-1350.
- (49) ZANELLA A., COLOMBO M. B., ROSSI F., MERATI G. AND SIRCHIA G. (1989) *Haematologica* **74**: 387-396.
- (50) ZARZA R., ALVAREZ, R., PUJADES, A., NOMDEDEU, B., CARRERA, A., ESTELLA, J., REMACHA, A., SÁNCHEZ, J. M., MOREY, M., CORTÉS, T., PÉREZ LUNG MUS, G., BU-

- REO, E., AND VIVES CORRONS, J. L. (1998) *British Journal Haematology* **103**: 377-382.
- (51) GARCIA S. C., MORAGÓN A. C. AND LÓPEZ-FERNÁNDEZ A. (1979) *Hum. Hered.* **29**: 310-313.
- (52) GILSANZ F., VEGA M. A., GÓMEZ-CASTILLO E. RUIZ-BALDA J. A. AND OMEÑACA F. (1993). *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal* **69**: 523-527.
- (53) BARONCIANI L. , MAGALHAES L.Q. , MAHONEY D. H., WESTWOOD B. ADEKILE A. D. LAPPIN T. R. J. AND BEULER E. (1995). *Blood Cell Mol. Dis.* **21**: 49-55.
- (54) ROUGER H., VALENTIN C., CRAESCU C. T., GALACTEROS F. AND COHEN-SOLAL M. (1996) *British Journal Haematology* **92**: 825-830.
- (55) BARONCIANI L., BIANCHI P. AND ZANELLA A. (1996) *Blood Cells Mol Dis.* **22**: 85-89.
- (56) KANNO H., FUJIL H. AND MIWA S. (1992). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **188**: 516-523.
- (57) KANNO H., FUJIL H., TSUJINO G. AND MIWA S. (1993) *Biochem Biophys Res Commun* Wei D. C., Chan L. C., Mizoguchi H. Nakahata T. Narisawa K. Fujii H. and Miwa S. (1994). *Blood* **83**: 3506-3509.
- (59) LENZNER C., NÜRNBERG P., THIELE B. J., REIS A., BRABEC V., SAKALOVA A. AND JACOBASCH G. (1994) *Blood* **83**: 2817-2822.
- (60) UENAKA R., NAKAJIMA H., NOGUCHI T., IMAMURA K., HAMAGUCHI T., TOMITA K., YAMADA K., KUWAJIMA M., KONO N., TANAKA T. AND MATSUZAWA Y. (1995) *Biochem Biophys Res Commun* **208**: 991- 998.
- (61) WHITNEY K. M. GOODMAN S. A. BAILEY E. M. LOTHROP C. D. JR. (1994) *Exp Hematol* **69**: 866-870.
- (62) LUZZATTO L. AND MEHTA A. (1995): The metabolic and Molecular Basis of inherited Disease. Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S. and Valle D.(eds). New York. MacGraw-Hill.
- (63) VAN SOLINGE W. W. , KRAAIJENHAGEN R. J. RIJKSEN G., VAN WIJK R., STOFFER B. B., GAJHEDE M. AND NIELSEN F. C. (1997) *Blood* **12**: 4897-4995.
- (64) BAUTISTA J. M. AND LUZZATTO L. (1997): Protein Dysfunction in Human Genetic Disease. Swallow D.M. and Edwards Y.H. (eds) BIOS Scientific Publisher Ltd. Oxford. UK

A. GARRIDO, J.M BAUTISTA

ANAL. REAL ACAD. NAL. FARM.

- (65) JURICA M. S., MESECAR A., HEATH P. J. SHI W., NOWAK T. AND STODDARD B. L.  
(1998) *Structure* **6**: 195-210.