

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



**GENÉTICA MOLECULAR DE LA DEFICIENCIA
ERITROCITARIA HUMANA EN PIRUVATO QUINASA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Amando Garrido Pertierra

Bajo la dirección de los Doctores:

José Manuel Bautista Santa Cruz
Bartolomé Ribas Ozonas

Madrid, 2002

ISBN: 84-669-2029-3

<i>Resumen</i>	<i>i</i>
<i>Summary</i>	<i>ii</i>
<i>Abreviaturas</i>	<i>iii</i>
I. Introducción	1
I. 1. Los eritrocitos	2
I. 1. 1. Características generales.....	2
I. 1. 2. Génesis, diferenciación y destrucción de los eritrocitos	3
I. 1. 3. Bioquímica del eritrocito	7
I. 1. 3. 1. Las rutas metabólicas en el eritrocito	9
I. 1. 3. 2. La regulación de la glucólisis en los eritrocitos	10
I. 1. 3. 3. El ciclo del 2,3-bisfosfoglicerato	12
I. 2. Las anemias hemolíticas	14
I. 3. Mutaciones, función proteica y fenotipo	17
I.3.1. Las alteraciones en las proteínas multiméricas	19
I. 4. Piruvato quinasa	22
I. 4. 1. Estructura tridimensional de la piruvato quinasa	24
I. 4. 2. Lesiones moleculares en la deficiencia piruvato quinasa	25
I.4. 3. El metabolismo de eritrocitos deficientes en piruvato quinasa	25
I. 4. 4. Mutaciones en el gen de la piruvato quinasa	28
I. 4. 5. Expresión y regulación del gen piruvato quinasa	30
I. 4. 6. Terapia habitual y génica en la deficiencia piruvato quinasa	30
 II. Objetivo del trabajo	 33
 III. Materiales y Métodos	 35
III. 1. Reactivos	36
III 2. Material biológico	36
III. 3. Aparatos utilizados	36
III. 4. Procedimientos generales	36
III. 4. 1. Extracción de DNA de células nucleadas humanas	37
III. 4. 2. Extracción de RNA total de sangre entera	37
III. 4. 3. Análisis electroforéticos	38
III. 4. 3. 1. Marcadores de tamaños de fragmentos de DNA	39
III. 4. 4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	39
III. 4. 5. Inserción y unión de los productos de PCR al vector pGEM-T	41
III. 4. 6. Transformación de células de <i>Escherichia coli</i>	43
III. 4. 7. Aislamiento de los plásmidos conteniendo los insertos de DNA	44

III. 4. 8 . Aislamiento y caracterización de los insertos plasmídicos	45
III. 4. 10. Secuenciación automática de DNA	46
III. 4. 11. Construcción de modelos moleculares	46
<i>IV Resultados y Discusión</i>	47
IV.1 Las mutaciones en piruvato quinasa y sus consecuencias fisiopatológicas	48
IV.1.1. Manifestaciones clínicas de pacientes defectivos en piruvato quinasa	48
IV.1.2. Caracterización molecular de pacientes con deficiencia en piruvato quinasa	51
IV.1.3. Naturaleza química de las mutaciones	53
IV.1.4. Distribución de la frecuencia de las mutaciones en piruvato quinasa	55
IV.1.5. Herencia genética de las deficiencias piruvato quinasa: Genealogías	59
IV.1.6. Localización de las mutaciones en los exones y en las regiones del gen piruvato quinasa	62
IV. 2. Las relaciones estructura/función de las enzimas defectivas en piruvato quinasa	66
IV.2.1. Los cambios aminoacídicos y sus efectos en la actividad piruvato quinasa	66
IV.2.2. Efectos de las mutaciones sobre la estructura de la piruvato quinasa: Modelos moleculares	67
<i>V. Conclusiones</i>	79
<i>VI. Bibliografía</i>	82

Resumen

La piruvato quinasa (ATP: piruvato 2- O- fosfotransferasa; EC 2.7.1.40) 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. En la especie humana han sido caracterizados dos genes diferentes: El PK-M que, se encuentra en el cromosoma 15 y, codifica las isoenzimas del tejido muscular y de los leucocitos y la PK-LR, que aparece en el cromosoma 1, que codifica las isoenzimas del hígado y de los eritrocitos. La deficiencia en piruvato quinasa, debida a una mutación en el gen PK-LR, origina alteraciones, únicamente, en el metabolismo de los eritrocitos, porque estas células no son capaces de compensar el defecto enzimático aumentando la síntesis de enzima mutada ni utilizar otras rutas degradativas. Por ello, la deficiencia de esta enzima es causa principal de la anemia hemolítica no esferocítica; los síntomas clínicos de esta enfermedad abarcan desde un estado hemolítico compensado hasta una anemia grave que puede provocar incluso la muerte de los pacientes.

Los métodos clásicos para estudiar las variantes con deficiencia piruvato quinasa han sido estandarizados por la Comisión Internacional de Estandarización en Hematología (ICSH). Sin embargo, la interpretación de los resultados bioquímicos de las enzimas deficientes en la actividad piruvato quinasa se ve dificultada por la alta frecuencia de heterocigotos que conducen a, presumiblemente, enzimas híbridas con diferentes propiedades moleculares. Además, debido a la baja actividad de la enzima en los eritrocitos de los pacientes, estos requieren constantemente sangre y la caracterización de la enzima deficiente se ve dificultada por las actividades de la enzima de los eritrocitos normales del donante y del producto del gen PK-M de los leucocitos. Estos problemas ha llevado a estudiar la enzimopatía eritrocitaria piruvato quinasa mediante técnicas de Biología Molecular, utilizando fundamentalmente la amplificación del gen PK-R mediante la reacción en cadena de la polimerasa y la secuenciación nucleotídica del mismo. Los resultados así obtenidos han proporcionado un diagnóstico exacto de la enfermedad y marcan la pauta a seguir en el transcurso de la misma, y facilitando la aplicación de una terapia adecuada.

El trabajo se realizó sobre 10 pacientes no relacionados familiarmente con deficiencia en piruvato quinasa eritrocitaria y anemia hemolítica no esferocítica. No se ha podido establecer una correlación directa entre el nivel de actividad de la enzima obtenido y el grado de alteración clínica observada. Mediante al 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.

El bajo nivel de actividad piruvato quinasa que se encuentra en aquellos pacientes con mutaciones localizadas en los dominios A y C del monómero se explica fácilmente porque dichos dominios son claves en la acción catalítica de la enzima. Sin embargo, no se ha encontrado una explicación lógica para la disminución de la actividad enzimática correspondiente a la sustitución aminoacídica Gly232 → Ser que se localiza en el dominio C del monómero, y en el que hasta el momento no se descubierto una función determinada en el proceso catalítico.

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

Summary

The enzyme pyruvate kinase (PK) (ATP: pyruvate 2-O-phosphotransferase) catalyses the transformation of phosphoenolpyruvate and ADP to pyruvate and ATP. The activity of this ubiquitous enzyme is essential for the central carbohydrate metabolism. Two genes encoding isoenzymes of PK have been characterized in human cells: PK-M from chromosome 15 is expressed in leukocytes and muscle tissue, and PK-LR from chromosome 1 is present in erythrocytes. Deficiency in PK activity causes non-spherocytic 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 range from a balanced haemolytic condition to severe anaemia, which may lead to death.

The International Commission for Standardization in Haematology (ICSH) provides biochemical methods to study the variants for deficiency in PK. However, results derived from enzymatic activities measurements may be misinterpreted due to the high frequency of heterocygous, which, presumably, produce hybrid enzymes. In addition, the low PK activity in the patient erythrocytes obliges to frequent blood transfusions, and donor pyruvate kinase may also lead to misleading results. These problems led to the application of molecular biology tools, basically the amplification of the PK-R gene using PCR and the sequencing of the products obtained. The results obtained have allowed the precise diagnosis of the disease, and also can help in its monitoring and the choice of therapy strategies.

The present work was performed on 10 PK deficient patients family-unrelated. It was not possible to establish a direct correlation between the enzymatic activities and the degree of physiological alterations. By means of molecular analysis, we have found 11 different mutations in the 17 alleles analysed, three of which have not been previously reported.

The low pyruvate kinase activity, found in patients harbouring mutations at the A and C domain, can be explained as these domains are essential for the enzyme activity. However, the reason for the low activity found in a mutant carrying the amino acidic substitution Gly232 -> Ser, located at the C domain, remains obscure, as this domain has not been associated with any catalytic process.

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.

- A:** Adenina
Å: Angström(s)
ADP: Adenosina difosfato
Ala: Alanina, (A)
AMP: Adenosina monofosfato
ATP: Adenosina trifosfato
Arg: Arginina, (R)
Asn: Asparragina, (N)
Asp: Acido aspártico, (D)
Asx: Asparragina o ácido aspártico (B)
BFU-E₁: Unidad formadora de células inmaduras
BFU-E₂: Unidad formadora de células de maduración media
BPF: Factor promotor de colonias
2,3-BPG: 2,3-bisfosfoglicerato
C: Citosina
cDNA: DNA complementario
CFU-E: Unidad formador de colonias de eritrocitos
CFU-G: Unidad formadora de colonias de granulocitos
CFU-LH: Unidad formadora de colonias linfoides y hematopoyéticas
CFU-S: Unidad formadora de colonias de bazo
CNSHA: Anemia hemolítica crónica no esferocítica
Cys: Cisteína, (C)
dATP: Desoxiadenosina trifosfato
dCTP: Desoxitimidina trifosfato
dCTP: Desoxicitidina trifosfato
dGTP: Desoxiguanosina trifosfato
DHAP: Dihidroxiacetona fosfato
DNA: Acido desoxirribonucleico
DNasa: Desoxirribonucleasa
dNTPs: Desoxinucleósidos trifosfato
FBP: Fructosa 1,6-bisfosfato
G: Guanina
Glu: Acido glutámico, (E)
Gly: Glicina, (G)
Glx: Glutamina o ácido glutámico, (Z)
G-SH: Glutation
Hb: Hemoglobina
Hb O₂: Oxihemoglobina
His: Histidina, (H)
ICSH: International Committee for Standardization in Haematology
IDH: Índice de la distribución estándar del volumen corpuscular de los eritrocitos
Ile: Isoleucina, (I)
Leu: Leucina, (L)
Lys: Lisina, (K)
MAT1A: Gen de la metionina adenosiltransferasa
Met: Metionina, (M)
mRNA: RNA mensajero
NAD⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada)
NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida)
NADP⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada)
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PEP: Fosfoenolpiruvato
Phe: Fenilalanina, (F)
PK: Piruvato quinasa
PK-M: Gen de las isozimas M₁ y M₂
PK-LR: Gen de las isozimas L y R
PK-M₁: (ó M₁), isozima M₁ de la piruvato quinasa
PK-M₂: (ó M₂), isozima M₂ de la piruvato quinasa
PK-L: (ó L), isozima L de la piruvato quinasa
Pro: Prolina, (P)
PK-R: (ó R), isozima R de la piruvato quinasa
RNA: Acido ribonucleico
RNasa: Ribonucleasa
T: Timina
Thr: Treonina, (T)
Trp: Triptófano, (W)
Tyr: Tirosina, (Y)
U: Uracilo
Val: Valina, (V)

I.1. Los eritrocitos

I.1.1. Características generales

Los eritrocitos, hematíes o glóbulos rojos son células sanguíneas cuya función principal es la de transportar el oxígeno desde los pulmones a los tejidos. Los eritrocitos normales son discos bicóncavos con un diámetro medio de, aproximadamente, 7-8 micras, un espesor en el centro de 1 micra y en su periferia, el punto más ancho, de 2,5 micras, y un volumen medio de 90 a 95 micras cúbicas.

La forma de los eritrocitos puede cambiar cuando atraviesan los capilares. En realidad son células que pueden deformarse adoptando casi cualquier forma. Además, debido a que posee una membrana celular de un tamaño bastante superior al perímetro del material que encierra, la deformación no fuerza la membrana demasiado y, en consecuencia, la célula no se rompe como sucede con las de otras clases. En los varones de la especie humana el número medio de eritrocitos por mililitro es de 5.200.000 y en las mujeres de 4.700.000, aunque varios factores como la altitud y, por tanto la presión de oxígeno, a la que viven las personas, pueden hacer variar estas cifras.

Los eritrocitos, además de transportar hemoglobina, realizan otras funciones y por ello contienen varias enzimas. Así, contienen una gran cantidad de anhidrasa carbónica que cataliza la reacción entre el dióxido de carbono y el agua para formar bicarbonato. La rapidez con que se lleva a cabo la reacción gracias a la acción catalítica de la enzima, que aumenta la velocidad 10^7 veces, hace que el agua de la sangre reaccione con el CO_2 y

transporte este compuesto desde los tejidos a los pulmones en forma de bicarbonato. En este sentido, los eritrocitos participan en el equilibrio ácido-base de la sangre ya que la hemoglobina que contienen es una excelente sustancia reguladora de dicho equilibrio.

Esta acción se realiza gracias a la interconversión entre la hemoglobina y la oxihemoglobina por el oxígeno, los protones y los sistemas reguladores hemoglobinato/hemoglobina y oxihemoglobinato/oxihemoglobina. En los alveolos pulmonares, con una elevada concentración de oxígeno, se favorece la conversión de hemoglobina en oxihemoglobinato y la liberación de protones mediante la anhidrasa carbónica que favorece la liberación de dióxido de carbono. Sin embargo, en los tejidos, debido al metabolismo, se produce dióxido de carbono y otros ácidos que disminuyen el pH, por lo que la transformación se realiza en sentido de oxihemoglobinato a hemoglobina favoreciendo la liberación de oxígeno y con ello una mayor participación del sistema hemoglobinato/hemoglobina. El conjunto de estos procesos impide que se produzcan grandes cambios de pH y que tengan lugar los correspondientes intercambios oxígeno/dióxido de carbono en los tejidos y en los alveolos pulmonares (Lozano y col., 1997)

Los eritrocitos tienen la capacidad de concentrar la hemoglobina en el líquido intracelular hasta los 340 mg/mL. La concentración nunca se eleva por encima de este valor porque constituye un límite metabólico del mecanismo de formación de hemoglobina en la célula. Cuando la formación de hemoglobina en la médula ósea es deficiente, el porcentaje de hemoglo-

bina en las células puede reducirse considerablemente por debajo de este valor y también reducirse el volumen de hematíes debido a la menor cantidad de hemoglobina que ocupa la célula.

Cuando el hematocrito (volumen de sangre ocupado por los eritrocitos) y la cantidad de hemoglobina de cada célula son normales, la sangre completa de los varones contiene una media de 160 mg de hemoglobina por mL y la de las mujeres una media de 140 mg/mL. Cada gramo de hemoglobina pura es capaz de combinarse con unos 2 mg de oxígeno. Por lo tanto, el varón normal puede transportar más de 300 mg de oxígeno combinados con la hemoglobina por cada litro de sangre y la mujer normal 270 mg (Guyton y Hall, 1996)

I.1.2. Génesis, diferenciación y destrucción de los eritrocitos

Las células sanguíneas derivan de células de la médula ósea llamadas células progenitoras hematopoyéticas pluripotenciales (Fig.1). A medida que estas células se reproducen, hecho que sucede a lo largo de la vida de una persona, una porción de ellas permanece en la médula ósea, exactamente igual que las células originales, aunque su número disminuye con la edad. Sin embargo, la mayor parte de las células pluripotenciales se diferencia para formar otras células sanguíneas: eritrocitos, monocitos, linfocitos, etc.

La primera descendencia no puede todavía diferenciarse de las células progenitoras pluripotenciales, aunque ya estén comprometidas en una línea celular particular, y se denominan células progenitoras comprometidas. Cuando estas células crecen en culti-

vos producen colonias de tipos específicos de células sanguíneas. Así, una célula progenitora comprometida que produzca eritrocitos se denomina unidad formadora de colonias de eritrocitos (CFU-E) (*colony forming unit erythrocyte*). De igual modo, las unidades formadoras de colonias que originan granulocitos y monocitos se designan CFU-G, CFU-M y así sucesivamente.

La proliferación y reproducción de las diferentes células progenitoras están controladas por múltiples proteínas llamadas inductores de la proliferación. Se han descrito cuatro inductores principales, cada uno con características diferentes. Uno de ellos, la interleucina-3, favorece la proliferación y reproducción de casi todos los tipos diferentes de células progenitoras, mientras que los otros inducen la proliferación sólo de tipos específicos de células progenitoras comprometidas.

Los inductores de la proliferación promueven este proceso, pero no la diferenciación de las células. Esta función está destinada a otro grupo de proteínas denominadas inductoras de la diferenciación. Cada una de ellas hace que un tipo de célula progenitora se diferencie en uno o más pasos hacia un tipo final de célula sanguínea adulta.

La formación de los inductores de la proliferación y diferenciación está controlada por factores externos a la médula ósea. Por ejemplo, en el caso de los eritrocitos, la exposición del organismo a una baja presión parcial de oxígeno durante un largo periodo de tiempo, provoca la inducción de la proliferación, la diferenciación y la producción de un número más elevado de eritrocitos. En el caso de algunos leucocitos, las enfermedades infec-

ciosas provocan la proliferación, la diferenciación y la formación final de tipos específicos de leucocitos que son necesarios para combatir la infección (Harrison, 1984).

El principal factor que estimula la producción de hematíes es una hormona circulante denominada eritropoyetina, una glucoproteína de 34 kDa. En diferentes estudios hematológicos se ha comprobado, que el papel esencial de la eritropoyetina es estimular la producción de proeritroblastos a partir de las células progenitoras hematopoyéticas en la médula (Rich, 1987).

En la formación de las células maduras sanguíneas en período de crecimiento y en la vida adulta participan, consecutivamente, tres clases de células independientes entre sí: Células pluripotenciales, células unipotenciales y células en fase de especialización.

La producción de eritrocitos, como de otras células de la serie mieloide (granulocitos, megacariocitos, etc.) tiene lugar en la médula ósea, mientras que los de la serie linfóide ocurre principalmente en el bazo y en los órganos linfoides. En el crecimiento y diferenciación de ambas series desempeñan un papel fundamental las células que forman parte del estroma de los distintos órganos (fibroblastos, preadipocitos, células endoteliales, etc.)

El hecho de que todas las células sanguíneas tengan una vida media limitada, exige que su producción transcurra a un ritmo continuo durante toda la vida del individuo con el fin de mantener un nivel constante de las mismas. Ello requiere la existencia de un acervo celular en la médula ósea, común para todas las líneas hematopoyéticas, que está constituido por una población relativamente pequeña de

células germinales no diferenciadas, las cuales se depositan en las cavidades óseas durante las primeras etapas de la embriogénesis. Aunque su número es pequeño, estas células poseen una gran capacidad de autorrenovación (producción de células hija germinales) y, además, se caracterizan por la posibilidad de diferenciarse en una serie de líneas celulares distintas (células pluripotenciales). Debido a esta capacidad precursora, tanto de la serie mieloide como de la linfóide, estas células germinales han recibido el nombre de unidad formadora de colonias linfoides y hematopoyéticas (CFU-LH).

La diferenciación de las células germinales conduce, por un lado, a la célula progenitora hematopoyética precursora de las series eritrocitarias, granulocítico-monocítica y megacariocítica y, por otro, a las células progenitoras linfopoyéticas que son específicas para la producción de los linfocitos T y B.

La célula progenitora hematopoyética pluripotencial recibe el nombre de unidad formadora de colonias de bazo (CFU-S). Entre sus características más importantes, resalta que tiene una elevada capacidad de autorrenovación permitiendo así satisfacer la demanda de células ejercida, tanto por parte del compartimento unipotencial como del propio pluri-potencial, y en la que es preciso sustituir aquellas células destruidas por accidente o enfermedad.

Como consecuencia del proceso de diferenciación celular surge, a partir de CFU-S, un grupo de células determinadas que sigue el desarrollo hacia una línea celular fija. Estas células unipotenciales son las progenitoras de las tres hematopoyéticas primordiales:

granulocítica, meganocítica y eritrocítica (Brewer, 1984).

Las células destinadas a la producción de eritrocitos se denominan células sensibles a la eritropoyetina, debido a que esta hormona controla la proliferación y diferenciación de los proeritroblastos. A diferencia de la CFU-S, presentan ciclos celulares mucho más cortos (mayor velocidad de proliferación) y tienen una menor capacidad de autorrenovación. De acuerdo con el grado de respuesta a la eritropoyetina y con su velocidad de proliferación, cabe distinguir tres tipos de poblaciones eritropoyéticas. El de células más inmaduras corresponde a la unidad formadora de colonias eritrocitarias que estallan (*burst*) o BFU-E₁, que surgen en respuesta a la acción sobre la CFU-S de un factor promotor de este tipo de colonias (BPF). Estas células requieren ciertos niveles de eritropoyetina y necesitan un largo período de incubación para que aparezca en ellas la diferenciación eritroblástica (Rich, 1987; Luque y col., 1991).

La acción del BPF conduce a la formación de un segundo tipo de colonias denominadas BFU-E₂ con mayor grado de maduración y que presenta un número elevado de receptores de membrana para la eritropoyetina. Es a partir de este último tipo, del que surge

el tercer subgrupo de formación denominado unidad formadora de colonias eritrocitarias normales (CFU-E), que precisan escasos niveles de eritropoyetina y un período de cultivo corto, para dar lugar al proeritroblasto. El segundo subgrupo de células unipotenciales (BFU-E₂) tienen una mayor velocidad de proliferación y es menos sensible a la eritropoyetina que el tercer subgrupo.

La primera célula que puede identificarse como perteneciente a la serie de eritrocitos es el proeritroblasto, el cual se divide varias veces formando muchos eritrocitos maduros (Fig.2). Las células de la primera generación se llaman eritroblastos basófilos porque se tiñen con pigmentos básicos; en este punto la célula ha acumulado muy poca hemoglobina. En las generaciones siguientes, las células se llenan de hemoglobina hasta una concentración de, aproximadamente, un 34 % del volumen total, al mismo tiempo que se reabsorbe el retículo endoplásmico. La célula en este estadio se llama reticulocito porque todavía contiene una pequeña cantidad de material basófilo, constituido por restos del aparato de Golgi, mitocondrias y otros pocos tipos de orgánulos citoplásmicos. Durante esta fase, los reticulocitos pasan de la médula ósea a los capilares san-

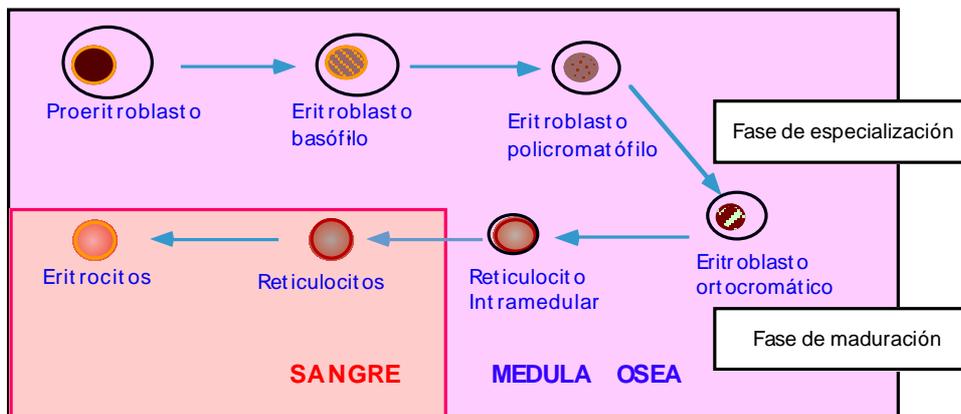


Figura 2. Desarrollo celular en médula ósea y sangre circulante, durante la fase de especialización y maduración celular de los eritrocitos

guíneos por estrangulamiento a través de los poros de la membrana capilar. El resto del material celular desaparece normalmente en 1 ó 2 días, y el reticulocito se convierte en un eritrocito maduro.

Cuando los eritrocitos pasan de la médula ósea al sistema circulatorio, normalmente circulan una media de 120 días, antes de ser destruidos. Aunque los eritrocitos maduros no tienen núcleo, mitocondrias, ni retículo endoplásmico, mantienen las enzimas citoplásmicas que son capaces de metabolizar la glucosa para formar pequeñas cantidades de ATP y, especialmente, de la forma reducida del nicotinamina adenina dinucleótido fosfato (NADPH). El NADPH, mediante su posición junto al glutatión en la cascada de reacciones de oxidoreducción, mantiene un ambiente reducido en la célula que sirve para eliminar el peróxido de hidrógeno y otras especies reactivas del oxígeno y posee importantes funciones en los eritrocitos, entre las que se encuentran: a) Mantener la flexibilidad de la membrana celular. b) Mantener el transporte de iones a través de la membrana. c) Mantener el hierro de la hemoglobina de la célula en estado ferroso y no férrico, lo que provocaría la formación de metahemoglobina d) Evitar la oxidación de las proteínas intracelulares.

Una vez que la membrana de los hematíes se hace frágil, la célula se rompe al pasar a través de algún estrechamiento del sistema circulatorio. Muchos de los eritrocitos se fragmentan en el bazo, porque se comprimen al pasar a través de su pulpa roja. Esto se explica porque los espacios entre los trabéculos estructurales de la pulpa roja, a través de los cuales deben pasar

la mayor parte de las células, son tan sólo de 3 nm de anchura mientras que el diámetro del eritrocito es más de 2,5 veces mayor (Brewer, 1980; Guyton y Hall, 1996; McMullin, 1999).

I.1.3. Bioquímica del eritrocito

Como se ha indicado anteriormente, el eritrocito es un elemento anucleado que realiza el transporte de oxígeno casi exclusivamente mediante la intervención de la hemoglobina.

A lo largo de su vida, un eritrocito recorre casi medio millón de veces el aparato circulatorio y, debido a que posee una resistencia mecánica excepcional y una gran flexibilidad, atraviesa continuamente circuitos de diámetro inferior a su propio tamaño; en cierto modo se comporta como un semisólido elástico y, aunque presenta una forma bicóncava, es una célula capaz de deformarse. Todas estas propiedades vienen condicionadas por varios factores que atañen a la membrana, entre los que destacan su composición lipídica, su carga electrostática y, en particular, la presencia de una rígida malla de proteínas adosada a la superficie citoplásmica que se denomina esqueleto submembranoso (Harrison, 1984).

La membrana de los eritrocitos se aísla con facilidad mediante un tratamiento con disoluciones hipotónicas o agentes tensioactivos, que provocan la hemólisis y, consecuentemente, la pérdida del contenido celular (integrado mayoritariamente por la hemoglobina). La membrana, así aislada, se denomina estroma, y mantiene su forma, tamaño, composición y permeabilidad características. Contiene un 40% de lípidos, un 52% de proteínas y un 8% de glúcidos. La bicapa que establecen

los lípidos es asimétrica en cuanto a la composición de sus dos láminas. (Bennet, 1985).

Aunque no está completamente establecida la disposición del esqueleto submembranoso, se conocen un gran número de detalles estructurales. El componente que constituye la trama filamentosa básica, y que supone la mitad de su masa total, es la espectrina, un heterodímero cuyas subunidades α y β , de pesos moleculares 260 y 225 KDa respectivamente, se unen entrelazándose de forma laxa, en sentido longitudinal; forman una especie de varillas de 100 nm de longitud que, a su vez, se asocian por la cabeza formando tetrámeros ($\alpha_2\beta_2$), cuya flexibilidad les permite adoptar muchas conformaciones. La espectrina es un componente fundamental del eritrocito, como indica su conservación estructural a lo largo de la evolución. Asociada lateralmente a ambas subunidades de la espectrina, en un punto próximo a la cola del dímero, se encuentra la actina, que está polimerizada (actina F), formando protofilamentos cortos integrados por 10 - 20 monómeros. Además del sitio de asociación con la actina, y muy cerca de éste, la espectrina posee un sitio de unión para otra de las proteínas componentes del esqueleto como es la banda denominada 4.1, con una masa de 78 kDa. Esta proteína es una molécula globular que, por un lado, promueve cooperativamente la unión espectrina-actina y, por otro, se liga al dominio citoplasmático de la glicoforina, y constituye así una de las uniones a la membrana. Es de destacar que para la unión de la banda 4.1 a la glicoforina, se requiere que esta última proteína interactúe con un determinado lípido de la bicapa, lo que concede un papel primordial a estos consti-

tuyentes en la fijación del esqueleto submembranoso.

Sin embargo, la unión principal no se efectúa directamente a la banda 4.1, sino a través de otra proteína, la anquirina (banda 2.1), que es una gran molécula piramidal de masa 240 kDa, que posee dos dominios estructurales; mediante uno de ellos se liga estrechamente a la espectrina y mediante el otro lo hace a una zona citoplasmática de otra proteína denominada banda 3. Así se establecen enlaces cruzados, constituyendo la anquirina el elemento primordial de fijación de la red filamentosa de la espectrina a la membrana.

I.1.3.1. Las rutas metabólicas en el eritrocito

A diferencia de otras células y de sus propios precursores, el eritrocito maduro carece de orgánulos subcelulares. En sentido estricto podría decirse que no es una célula viva, al menos como las demás, puesto que no puede sintetizar proteínas, glucógeno ni lípidos y es incapaz de llevar a cabo la fosforilación oxidativa. En consecuencia, su metabolismo, muy reducido, queda limitado a la glucólisis, ciclo de las pentosas fosfato, ciclo del 2,3-bifosfoglicerato, reacciones de oxidoreducción para la detoxificación de sustancias oxidantes y ciertos aspectos del metabolismo nucleotídico. Estas rutas y reacciones son justamente las precisas para mantener sus necesidades metabólicas durante los 4 meses de vida media celular. El eritrocito requiere la energía para la realización del transporte iónico (sodio, potasio y cloro, principalmente), para el mantenimiento del hierro de la hemoglobina en su forma divalente, de los grupos

sulfhidrido de las proteínas enzimáticas y de la hemoglobina en estado reducido y para la conservación de su propia morfología celular. Por otro lado, contiene una concentración de fosfatos orgánicos del orden de 50 a 100 veces superior a la existente en el plasma, la mayoría de los cuales son de naturaleza orgánica (azúcares-fosfatos y ATP). Gracias a la producción de un fosfato orgánico característico, el 2,3-bifosfato, el eritrocito puede modular, en combinación con el pH y la presión de CO₂, el grado de eficiencia con que el oxígeno es cedido a los tejidos.

La glucolisis comienza con la incorporación de monosacáridos a la célula; la glucosa y la fructosa, transportadas al interior de la célula por un proceso de difusión facilitada, mediante un transportador común, son también fosforiladas en el carbono 6 por la hexoquinasa (Fig.3). La velocidad de transporte de la fructosa es mucho mayor que la de la glucosa, por lo que aquella puede acumularse en el interior del eritrocito. La presencia de glucosa a concentración fisiológica, inhibe la utilización *in vivo* de la fructosa, tanto en el transporte como en la fosforilación. Ello demuestra que la fructosa no es un sustrato fisiológico para el eritrocito, y confirma que sólo se emplea metabólicamente en ausencia de glucosa. La galactosa también es transportada por difusión facilitada, y una vez fosforilada a galactosa-1-fosfato por la galactoquinasa, se introduce en la glucolisis mediante la intervención de la uridin bisfosfato glucosa (UDPG) y la acción de la galactosa 1-fosfato uridil transferasa, la UDPG-4-epimerasa y la fosfoglucomutasa. La glucosa 6-fosfato que se forma se isomeriza a fructosa-6-fosfato mediante la fosfohexosa isomerasa, con lo que se inicia la secuencia de reacciones

características de la glucolisis hasta la formación de lactato como producto final (Brewer, 1980, 1984).

Las enzimas glucolíticas del eritrocito se han aislado y en ellas se han determinado sus propiedades cinéticas y reguladoras. Se conocen todos los valores de la actividad enzimática eritrocitaria en condiciones estandar 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, *in vitro* tampoco se tiene en cuenta el efecto activador o inhibidor de muchos metabolitos intracelulares o la interacción mutua de las innumerables proteínas presentes. Aunque el significado de los valores de la actividad encontrada bajo condiciones *in vitro*, tienen validez por haber sido determinadas todas ellas bajo las condiciones de máxima actividad, lo cierto es que no suponen una extrapolación real de las actividades enzimáticas presentes en la célula bajo situaciones fisiológicas normales. De ahí que exista en la actualidad, una tendencia a encontrar sistemas de medidas de actividades en condiciones más próximas a las fisiológicas (sistemas *in situ*) por las enormes dificultades que existen para realizarlo *in vivo*. (Beutler, 1986).

1.1.3.2. La regulación de la glucolisis en los eritrocitos

El control de la glucolisis en el eritrocito se ejerce mediante la acción de distintos metabolitos sobre las tres enzimas que catalizan reacciones irre-

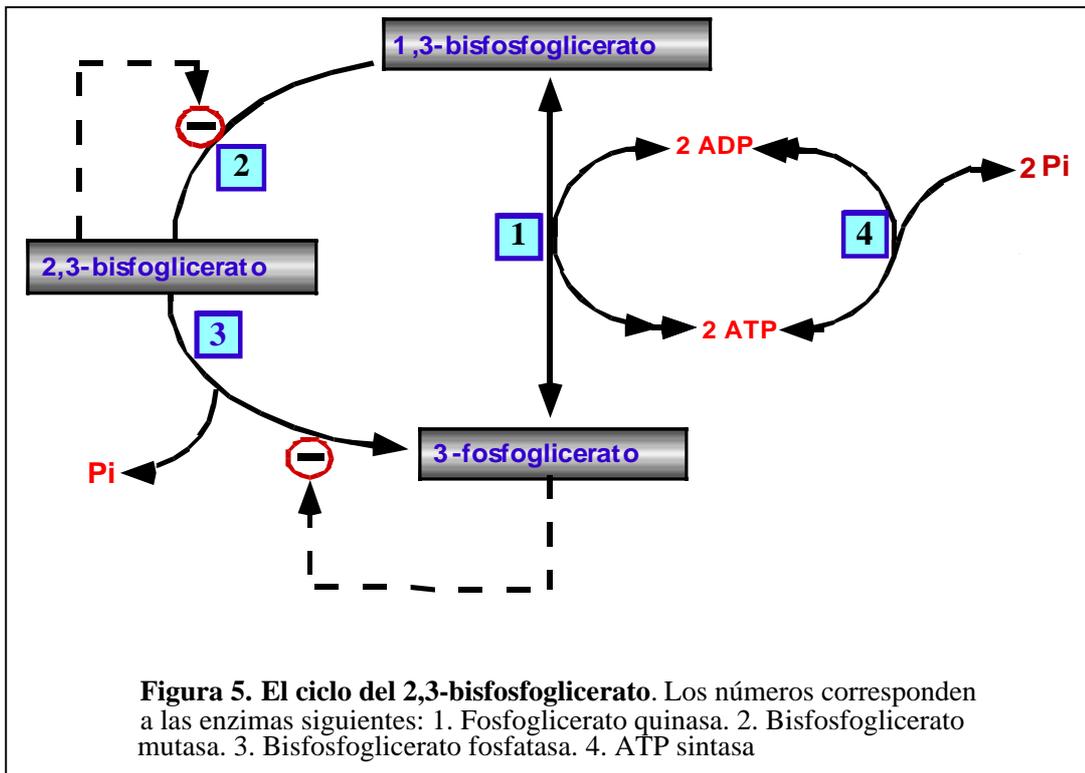
versibles, y que cumplen con todas las condiciones para considerarlas reguladoras: hexoquinasa, fosfofructoquinasa y piruvato quinasa (Fig.4). El efector más importante es el ATP que, al sobrepasar determinados niveles, inhibe la fosfofructoquinasa y la piruvato quinasa. Ello conlleva una disminución de la utilización de glucosa por la ruta glucolítica y un aumento de la concentración de los sustratos correspondientes de ambas enzimas sobre todo de la fructosa-6-fosfato; lo cual es importante a efectos de regulación, puesto que supone, al mismo tiempo, un aumento de la glucosa-6-fosfato, debido a la reversibilidad de la reacción catalizada por la glucosa-6-fosfato isomerasa. Al ser la glucosa 6-fosfato un inhibidor de la hexoquinasa, se refuerza la acción inhibitoria de la glucólisis ejercida por el ATP sobre la fosfofructoquinasa. Cuando, como consecuencia de la alta concentración de ATP, disminuya la actividad fosfofructoquinasa, también descenderá la concentración del producto de la reacción, la fructosa 1,6-bifosfato, con lo que desaparece igualmente el efecto activador de este compuesto sobre la fosfofructoquinasa y la piruvato quinasa (McGilvery y Murray, 1974). Todo ello contribuye al detenimiento o entrecimiento más o menos parcial, de la glucólisis. Ahora bien, el efecto inhibitorio global del ATP sobre la glucólisis puede contrarrestarse y, por tanto, el flujo metabólico restaurarse, gracias, fundamentalmente, a la acción desinhibidora de determinados metabolitos frente a la inhibición de la fosfofructoquinasa por ATP. De entre tales efectos alostéricos destaca el del AMP, que se origina en la hidrólisis del propio ATP cuando su concentración es alta, mediante la intervención de la ATPasa. El descenso de los ni-

veles de ATP hace que desaparezcan los efectos inhibitorios directos sobre la fosfofructoquinasa y la piruvato quinasa y los indirectos sobre la hexoquinasa reactivándose la degradación glucolítica de la glucosa (Beutler, 1986a; Luque y col., 1991).

También deben tenerse en cuenta las posibles variaciones del pH que tienen lugar durante la oxigenación y la desoxigenación de la hemoglobina ($\text{HbO}_2 + \text{H}^+ = \text{HbH} + \text{O}_2$). De nuevo, el principal punto de regulación por medio del pH se ejerce sobre la fosfofructoquinasa cuya actividad responde positivamente al aumento del pH y negativamente a la disminución del mismo. La liberación de oxígeno en los tejidos supone un aumento del pH intracelular, lo que equivale a un incremento de la actividad fosfofructoquinasa y, por tanto, de la glucólisis. Por el contrario, como consecuencia del proceso de oxigenación de la hemoglobina en los pulmones, aumenta la concentración de hidrogeniones y disminuye el flujo glucolítico (Yoshikawa y Rapoport, 1974; Perutz, 1990).

1.1.3.3 El ciclo del 2,3-bifosfoglicerato

En la ruta glucolítica de los eritrocitos existe una desviación a nivel del 1,3-bifosfoglicerato en la que, a partir de esta sustancia, por acción de la bifosfoglicerato mutasa, se produce 2,3-bifosfoglicerato. La enzima requiere 3-fosfoglicerato como cofactor y es inhibida por el propio producto de la reacción, el 2,3-bifosfoglicerato (Fig. 5). La degradación del 2,3-bifosfoglicerato mediante la enzima bifosfoglicerato fosfatasa, libera fosfato y conduce a la formación de 3-fosfoglicerato que se incorpora de nuevo a



la secuencia glucolítica. La actividad de esta enzima es inhibida fuertemente por el producto de la reacción, el 3-fosfoglicerato (Perutz, 1990).

Es bien conocido el papel esencial que desempeña el 2,3-bisfosfoglicerato 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. La hemoglobina en estado oxigenado no tiene afinidad por el 2,3-bisfosfoglicerato ya que, como consecuencia de la oxigenación, se produce un estrechamiento en la cavidad central de la estructura proteica. En cierto modo este hecho supone una competencia entre el 2,3-bisfosfoglicerato y el oxígeno molecular, en el sentido de que, en el primero tiende a prevalecer unido a la forma no

oxigenada, mientras que en el segundo tiende a formar oxihemoglobina con la consiguiente liberación del 2,3-bisfosfoglicerato.

El significado fisiológico del 2,3-bisfosfoglicerato se encuentra en su papel estabilizador de la estructura cuaternaria de la desoxihemoglobina. En su ausencia, la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno sería de tal entidad que prácticamente no permitiría la liberación del gas al pasar la sangre por los capilares tisulares. La presencia del fosfato supone un descenso de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno y, por tanto, una mayor facilidad para la liberación de éste en los tejidos (Perutz, 1990).

La regulación de los niveles de 2,3-bisfosfoglicerato viene condicionada por la concentración de ADP, cuya disminución conlleva un aumento del 1,3-bisfosfoglicerato, puesto que así lo exige el equilibrio de la reacción ca-

talizada por la fosfoglicerato quinasa (Figs. 4 y 5). El aumento de 1,3-bifosfoglicerato favorece la síntesis de 2,3-bifosfoglicerato, mientras que, por el contrario, el aumento de ADP hará disminuir los niveles de 1,3-bifosfoglicerato y, por tanto, la síntesis de 2,3-bifosfoglicerato.

Cuando la síntesis de este fosfato se encuentra favorecida, también disminuye el nivel de 3-fosfoglicerato, con lo que desaparece el efecto inhibitor que este compuesto tiene sobre la bifosfoglicerato fosfatasa, colaborando así a que el 2,3-bifosfoglicerato sea degradado para recuperar su nivel y, en definitiva, para que se restablezca el flujo metabólico normal de la ruta.

I.2. Las anemias hemolíticas

Las alteraciones que afectan a los eritrocitos pueden ser clasificadas en dos grandes grupos, teniendo en cuenta sus manifestaciones clínicas más características (Tabla 1). Las anemias, que vienen definidas por una reducción del número de eritrocitos, de la concentración de hemoglobina o del valor del hematocrito, y las policitemias, que vienen definidas por una elevación en el número de eritrocitos (Hardisty y Weatherall, 1982).

Existen anemias por pérdida de sangre, por disfunción de la médula ósea, y por deficiencia vitamínica de B₁₂ o de ácido fólico. 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 (Gilsanz, 1996a, 1996b).

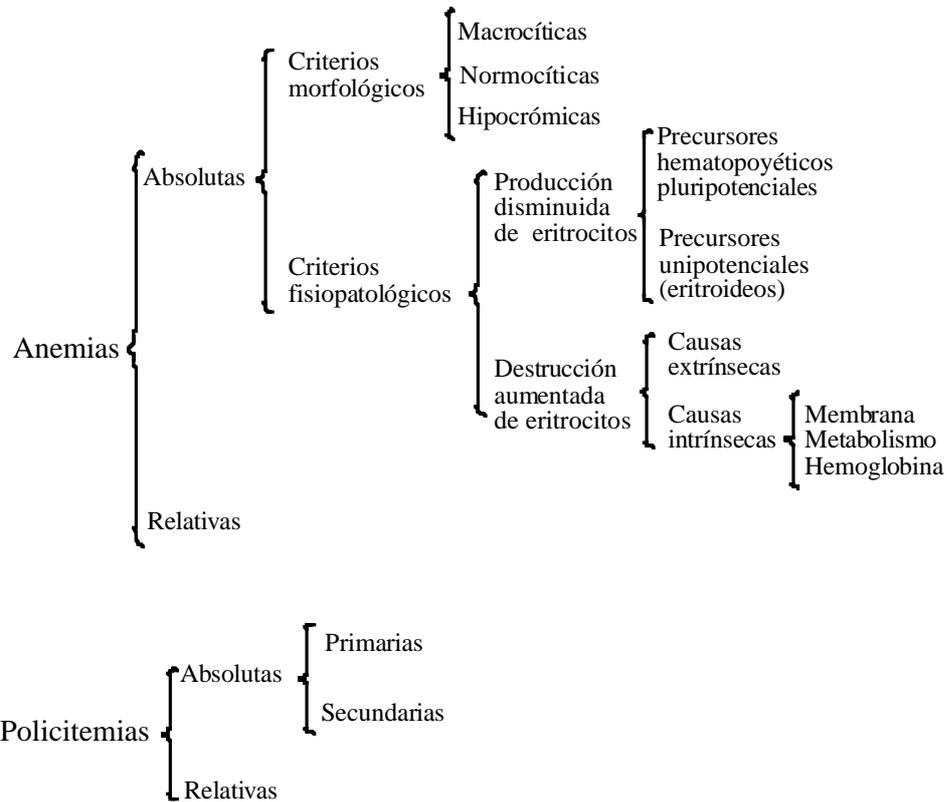
Se han descrito diferentes clases de anemias, siendo las más frecuentes:

Anemia hemolítica esferocítica o esferocitosis hereditaria. En este tipo de anemia los hematíes pierden su forma natural de disco bicóncavos y pasan a ser esféricos y de tamaño menor. En estas células existe una deficiencia en la síntesis de una de las dos cadenas de la espectrina, la proteína de membrana que circunda y protege al eritrocito como una malla (Selwyn y Dacie, 1954). Los eritrocitos con esta deficiencia no pueden comprimirse porque la membrana carece de estructura y al pasar a través de la pulpa esplénica, o simplemente por una ligera compresión, se rompen con facilidad (McGilvery, 1988; Lecomte et al., 1997).

Anemia de células falciforme o drepanocitosis. Esta enfermedad es debida a que los eritrocitos contienen una hemoglobina denominada hemoglobina S, formada con cadenas β anormales. Se denomina así porque, en presencia de oxígeno, precipita en cristales alargados dentro de los eritrocitos que le dan un aspecto de hoz. La hemoglobina precipitada lesiona la membrana celular produciendo células muy frágiles.

Eritroblastosis fetal. Este tipo de anemia se origina cuando los hematíes Rh-positivos del feto reaccionan con los anticuerpos Rh-negativos de la progenitoras. Estos anticuerpos debilitan las células provocando una ruptura rápida y haciendo que el recién nacido sufra una anemia grave.

Tabla 1. Trastornos patológicos de los eritrocitos



Enzimopatías eritrocitarias. Esta clase de anemia es debida a una deficiencia en algunas de las enzimas del metabolismo intermediario del eritrocito, generalmente las del metabolismo de la glucosa. Es posible subdividir las enzimopatías en grupos de acuerdo con la vía metabólica donde se localiza la deficiencia: glucolítica, fosfatos de pentosa, nucleotídico, etc. Todas ellas se caracterizan, en general, por la ausencia de esferocitosis, presión osmótica y hemoglobina normales. Los defectos enzimáticos pueden aparecer bajo

formas homocigóticas, heterocigóticas, acompañados de hemólisis celular y cuyo mecanismo desencadenante depende de la lesión molecular.

La sintomatología similar que presentan estas alteraciones ha resultado un escollo difícil de superar para conocer la causa de los diferentes tipos de anemia y, por ello, se han requerido numerosas observaciones experimentales y clínicas. Así, en 1950 Crosby y col. describieron estas enfermedades como anemias hemolíticas no esferocíticas de carácter hereditario. Tres

años más tarde Dacie y col. (1953) las clasificaron en dos tipos, I y II, basados en que a las de tipo II la adición de glucosa no corregía la mayor velocidad de autohemólisis; este hecho sugería una alteración en la ruta de Embden-Meyerhof. De Gruchy y col., (1960) y Robinson y col., (1961) describieron que los pacientes de tipo II con anemia hemolítica no esferocítica tenían altas concentraciones de 2,3-bisfosfoglicerato en los eritrocitos. En ese mismo año, Valentine y col. (1961) determinaron la actividad de las enzimas glucolíticas en pacientes de tipo II descubriendo que tenían una deficiencia en piruvato quinasa.

Los eritrocitos en sus 120 días de vida realizan $1,7 \times 10^5$ ciclos, para lo que requieren un continuo suministro de ATP y equivalentes redox que se utilizan en mantener la estructura biconcava, las concentraciones catiónicas intracelulares específicas, y el estado reducido, de los átomos de hierro de la hemoglobina, de los grupos sulfhidrilo de las enzimas, del glutatión y los componentes de la membrana. Naturalmente, si existe, una deficiencia en alguna de las enzimas de las rutas metabólicas, se limita principalmente la producción de ATP y NADPH.

La mayoría de las necesidades metabólicas de los eritrocitos son cubiertas por la glucólisis, la ruta de los fosfatos de pentosa, el ciclo del glutatión, el metabolismo nucleotídico y la Meta Hb reductasa. Han sido descritas deficiencias enzimáticas hereditarias en todas las rutas y las que causan anemias hemolíticas no esferocíticas aparecen en la Tabla 2. Sus frecuencias difieren marcadamente con respecto a la enzima afectada y a la distribución geográfica. Hay más de 400 millones

de personas afectadas con deficiencias en glucosa 6-fosfato deshidrogenasa en nuestro planeta. La frecuencia de gen más alta ha sido encontrada entre las población del área mediterránea y del sudeste asiático, los judíos kurdos y los negros africanos y americanos (Luzzatto y Mehta, 1995).

Sin embargo, en la Europa Central y del Norte, la frecuencia en la deficiencia en glucosa 6-fosfato deshidrogenasa es comparable a la de piruvato quinasa, la enzimopatías más frecuente en este área (Beutler, 1990; De Medicis y col., 1992; Luzzatto y Mehta, 1995). La relación entre el grado de deficiencia enzimática y la extensión de la disfunción metabólica en los eritrocitos y otros tejidos depende de varios factores como son la importancia de la enzima afectada, su velocidad de expresión, la estabilidad de la enzima mutada frente a la degradación proteolítica y las anormalidades funcionales, así como de la posibilidad de compensar la deficiencia por una sobreexpresión de alguna isoenzima correspondiente o por la utilización de una ruta metabólica alternativa.

En los casos más severos, las dificultades en estimar el grado cuantitativo de la lesión son debidas a que estas poblaciones celulares contienen muchos reticulocitos que tienen actividades enzimáticas y concentraciones de intermediarios superiores y diferentes a las de los eritrocitos.

I.3. Mutaciones, función proteica y fenotipo.

En 1956, Ingram propuso que el fenotipo de la anemia falciforme (*sickle cell anemia*) podía ser debido a la sustitución de un aminoácido (ácido glutámico) por valina en la β -

hemoglobina. Siguiendo con esta extraordinaria idea en genética humana, los estudios es-structurales del mutante proporcionaron explicación para entender la anemia y su alta frecuencia observada en las poblaciones de aquellas regiones en que esta enfermedad es endémica. Desde entonces los avances en la tecnología molecular han añadido nuevas dimensiones a la capacidad para analizar la disfunción proteica.

Mientras los desórdenes genéticos nos proporcionan la oportunidad de observar los efectos fenotípicos de los cambios que aparecen en el DNA, los genes mutados *in vitro* son de gran valor, especialmente cuando las mutaciones se diseñan utilizando la estructura proteica tridimensional. Avances en la tecnología de la información y otras metodologías basadas en la computación, se han centrado en este área no sólo por la provisión de datos para estudios comparativos, sino también para diseñar y realizar predicciones estructura-función.

Por conveniencia, las mutaciones se clasifican con respecto a sus efectos sobre las proteínas, pero esta clasificación es, inevitablemente, algo arbitraria. Las mutaciones asociadas con enfermedades genéticas pueden deberse a deleciones, inserciones que producen la terminación prematura de la cadena, simplemente a un cambio del codon que origina la sustitución de un aminoácido, a una pequeña duplicación intrínseca o a la inestabilidad del mRNA. También, aunque con menor frecuencia, pueden encontrarse mutaciones en los promotores o en el proceso de corte y empalme del mRNA (*splicing*). Estas categorías no se pueden diferenciar respecto a la función proteica, puesto que la producción de proteína anormal puede también estar

asociada a la pérdida completa de la función debida a la inestabilidad de la proteína que le impide alcanzar correctamente su lugar de acción, o también a una mutación en una región crítica, como por ejemplo el centro activo de una enzima. Sin embargo, en muchos casos aparecen situaciones complejas debidas a las interacciones de unas proteínas con otras y con componentes celulares tales como ligandos, sustratos y otras moléculas (Dacie, 1985).

Las mutaciones puntuales, deleciones o inserciones pueden, como se ha indicado anteriormente, conducir a una terminación prematura de la cadena. En estos casos puede sintetizarse una proteína incompleta aunque, a menudo, el mRNA o la proteína muestren una estabilidad reducida. La ruptura o corte puede conducir a una proteína anormal o a la inestabilidad del transcripto. Niveles bajos de mRNA pueden también proceder de mutaciones en el promotor. Muchas mutaciones sin sentido, así como pequeñas deleciones e inserciones, alteran el plegamiento y las afinidades entre las subunidades. En muchas ocasiones el plegamiento de las proteínas en la célula está facilitado por la interacción con proteínas denominadas chape-roninas o carabinas, las cuales también protegen a las cadenas nascentes de las proteínas, de las posibles interacciones con otras moléculas del retículo endoplásmico. Las mutaciones que rompen las interacciones con las chaperoninas, a menudo conducen a la inestabilidad proteica y/o a la pérdida de la actividad funcional. (Thomas y col., 1995). En particular, este parece ser el caso para proteínas lisosomales, secretoras y de la membrana plasmática.

Un estudio interesante en el que se observa cómo las mutaciones conducen a un plegamiento defectuoso con pérdida de la estabilidad, es el descrito por nuestro equipo sobre la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de eritrocitos. (Gómez-Gallego y col. 1996, 2000). La variante A⁻, que muestra deficiencia enzimática, difiere de la variante B o forma normal en dos aminoácidos. La doble sustitución aminoacídica se traduce en un plegamiento defectuoso debido a la pérdida de interacción entre las estructuras secundarias de las regiones donde se localizan las mutaciones. El centro activo de la enzima no se modifica pero los cambios que se originan entre los residuos aminoacídicos en el dominio del coenzima y la alteración parcial de la estructura terciaria son suficientes para producir un notable descenso de la estabilidad de la proteína en el eritrocito.

En algunas ocasiones las mutaciones se localizan en sitios enlazables para los sustratos, los efectores, los ligandos u otras proteínas (Leblond y col., 1978). En otras ocasiones los efectos principales no se corresponden con ninguno de los descritos anteriormente sino con una acumulación excesiva de la proteína anormal. En esas condiciones una actividad del 10-20% suele ser suficiente para permitir su funcionamiento en circunstancias normales. Esto significa que los heterocigotos, con un alelo normal, se encuentran afectados en pocas ocasiones, ya que la forma de expresarse una enfermedad es recesiva. Las mutaciones en las proteínas estructurales demuestran fácilmente el carácter hereditario de una enfermedad; también cuando la síntesis de la cadena proteica es menor del 50% de la normal se puede esperar que sea insuficiente para desarrollar

una función normal (Baronciani y col., 1996a, 1996b).

En proteínas fibrosas la alteración en la estructura secundaria puede conducir a una polimerización en fibrillas insolubles con consecuencias graves. Por ejemplo, la estructura alterada de una proteína origina placas amiloides y depósitos de tejido lipídico eosinófilo característico de la enfermedad de Alzheimer, el cual está compuesto de formas insolubles de proteínas normales como la gelsolina, transtiretina y lisozima (Booth y col., 1997).

Muchas proteínas sufren modificación durante o después de la traducción. Algunos cambios se miden enzimáticamente, incluyendo la proteólisis, fosforilación y glicosilación. Las mutaciones en los aminoácidos que determinan estas modificaciones pueden conducir a un fallo en el proceso normal. Así, mutaciones que originan restos glucosilados han sido descritos en el factor VIII de la sangre.

Las mutaciones de las enzimas en el proceso de síntesis son, generalmente, pleiotrópicas en sus efectos. Esta es una condición bien conocida en la mucopolidosis II o enfermedad celular EI en la que son deficientes numerosas enzimas lisosomales. La causa primaria de este desorden es la deficiencia en N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa, la cual está implicada en la generación de residuos fosfomanosilos de enzimas lisosomales (Kaufman y Pipe, 1997).

I.3.1. Las alteraciones en las proteínas multiméricas

Las mutaciones en genes que codifican proteínas con una estructura multimérica o aquellas implicadas en

un complejo multiproteico, frecuentemente tienen otros efectos además de la simple pérdida de función. En algunos casos un fenotipo severo surge de un alelo mutado que codifica una proteína en un heterocigoto individual. Este tipo de herencia que se refiere como “dominante negativo” puede implicar, por ejemplo, un polipéptido mutante. Los portadores heterocigóticos de tales mutaciones están más o menos afectados dependiendo de la intensidad del efecto en la subunidad mutada.

Las mutaciones en heterocigotos que implican proteínas multiméricas, a menudo no muestran un fenotipo clínico. Por ejemplo, los heterocigotos deficientes en la actividad de galactosa-1-fosfato uridil transferasa (GALT) no muestran síntomas de galactosemia, aunque existe un aumento de riesgo de problemas oftalmológicos y ginecológicos (Elsevier y Fridovich-Kiel, 1996). Se ha encontrado una mutación puntual que cambia Gln 188 por Arg en el 60-70% de los casos. GALT funciona como un dímero, compuesto de subunidades idénticas, cada una con su centro activo y el polipéptido mutante Arg 188, inactivo, que se unen como homodímeros y heterodímeros activos con la subunidad Gln 188.

Las interacciones entre las subunidades son de una gran importancia para los factores de transcripción en el contexto de la enfermedad humana, puesto que muchos funcionan como dímeros o tetrámeros y la flexibilidad transcripcional puede conseguirse por formación de heterodímeros con otro miembro de la misma familia genética. Por lo tanto, una mutación en la estructura del dominio afectará las propiedades enlazantes y tendrá una repercusión directa en el proceso de re-

presión-activación del DNA. Así, los centros enlazantes de DNA en los promotores de los genes objetivo pueden estar bloqueados por factores transcripcionalmente inactivos, y esto puede originar efectos negativos en el complejo dominante. Hay, a menudo, ejemplos ilustrativos que implican a familias diferentes de factores de transcripción. Entre ellos está el dominio POU (Pit-Oct-Unc) en el que han sido identificadas las proteínas mutadas que inhiben el proceso transcripcional, formando homodímeros y heterodímeros inactivos (Treacy y col., 1991).

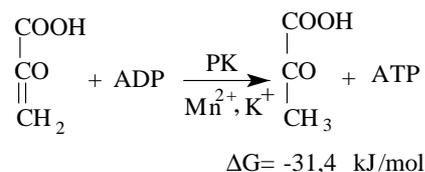
Las interacciones entre las subunidades, pueden explicar también cómo las formas dominantes y recesivas de la herencia surgen de mutaciones diferentes en un gen simple. Por ejemplo, la hipermetionuria persistente, como la mayoría de las deficiencias enzimáticas, se hereda generalmente como rasgo autosómico recesivo y se debe a mutaciones en el gen de la metionina adenosil-transferasa (MAT1A). Sin embargo, la herencia dominante se ve también en un número pequeño de familias. El gen MAT1A se expresa en el hígado y codifica dos isozimas: MATI y MATII que son tetrámeros y dímeros, respectivamente, formados de subunidades idénticas. En familias que muestran herencia recesiva, las mutaciones, generalmente, conducen a una terminación de la cadena de forma prematura con pérdida de función. Sin embargo, en familias que muestran herencia dominante una mutación G—A en un alelo, conduce a un cambio en la posición 264 de Arg a His provocando pérdida de actividad enzimática (29% de la normal). En 1997 Chamberlin y col., mediante experimentos de co-transfección y mutagénesis *in vitro*, demostraron cómo la

mutación MAT1A se traduce en un fenotipo negativo dominante parcial obteniendo varios cDNA de MAT1A con mutaciones en el residuo aminoácido 264 y los expresaron en *Escherichia coli*. Estos contenían actividad enzimática MAT1A cuando retenían una carga positiva en la posición 264, pero perdían, casi totalmente, la actividad y la capacidad para formar dímeros. Los estudios cristalográficos realizados sobre este gen revelaron que el residuo 264 está implicado en la formación de enlaces electrostáticos entre las subunidades.

A partir de las consideraciones anteriores, se puede deducir que muchas proteínas funcionan como moléculas heteroméricas (espectrina, β -hexosaminidasa y hemoglobina) y proteínas complejas, las cuales se forman por unión a partir de los productos de algunos genes que funcionan como una unidad, y son particularmente vulnerables a las mutaciones contribuyendo a cambios en las estructuras. A menudo, las mutaciones en genes diferentes que codifican los polipéptidos componentes originan el mismo o similar fenotipo clínico. Las mutaciones en los genes SPTA o SPTB que codifican las subunidades de espectrina, se traducen en una elipsocitosis hereditaria dominante autosomal. De la mayoría de las mutaciones en el gen de HFE resulta un descenso en la capacidad de los heterodímeros para formar tetrámeros que se traduce desde una enfermedad fenotípica a una anemia hemolítica severa.

1.4. Piruvato quinasa

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. Los iones divalentes manganeso o magnesio, y el potasio son absolutamente necesarios para la actividad de la enzima. La enzima, que es clave en la ruta central del metabolismo de los hidratos de carbono aparece en todas las células vivas, y en aquellas en que tiene lugar simultáneamente reacciones de la ruta glucolítica y gluconeogénica, juega un papel importante en la regulación de ambos procesos inversos (García-Olalla y Garrido-Pertierra, 1987)

En la especie humana se han identificado dos genes codificantes de la piruvato quinasa, el PK-M y el PK-LR (Fig 6). En el proceso de transcripción, estos dos genes originan 4 isoenzimas o isozimas diferentes con actividad piruvato quinasa, denominados M₁, M₂, L y R, las cuales se expresan de forma diferente en cada tejido u órgano (Noguchi y col., 1987; Consler y col., 1989). 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.

La PK-M₂ se encuentra presente en numerosos tejidos durante la vida fetal, y es codificada por el *locus* 15q22. Al final del periodo fetal y en el postnatal temprano, aparecen otras isozimas, pero la forma M₂ persiste en leucocitos, plaquetas, pulmón, riñones, bazo, tejido adiposo y, como un componente menor, en hígado. La enzima

desaparece, normalmente, durante la maduración de los eritroblastos (Miwa y Fujii, 1985, Miwa, 1990).

La isoenzima PK-M₁ es un producto del mismo *locus* genético que la M₂, pero el mRNA sufre un reagrupamiento o ajuste diferencial. Esta forma predomina en el músculo estriado y en el tejido cerebral. La forma M₁ es la única de las isoenzimas con actividad PK, que no está sujeta a modulación alostérica por el sustrato ni por el cofactor (Oberfelder y col., 1984)

La isoenzima PK-L es la forma de isozima que predomina en los hepatocitos y está codificada por el PK-LR gen en el *locus* 1q21 (Marie y col., 1981; Cognet y col., 1987)). La PK-L es un homotetramero en el que cada subunidad está constituida por 543 aminoácidos. En células eritroides inmaduras, las subunidades de la PK-L tienen un peso molecular superior a las correspondientes de los hepatocitos y se las designan por L'. Las subunidades L' se pueden convertir *in vitro* en subunidades L en condiciones proteolíticas suaves, e *in vivo* por proteólisis provocada por la evolución progresiva de las diferentes isozimas eritrocitarias cuando las células maduran (Miwa, 1990).

La isozima PK-R se encuentra bajo control del mismo *locus* genético que la PK-L, pero es un producto del proceso de traducción con un mRNA diferente al de la forma L, que está modificado en el extremo 5' y con promotores específicos. La isozima PK-R de células eritroides inmaduras está compuesta predominantemente por homotetrámeros L'(L'₄) y se designa PK-R₁. Por proteólisis el PK-R₁ se convierte en heterotetrámeros (L'₂L₂), y se designa PK-R₂ que es la forma mayoritaria en eritrocitos maduros la

cual, a su vez, se puede convertir *in vitro* por proteólisis en la forma PK-L. Los homotetrámeros L y L' tienen diferentes características bioquímicas que pueden ser funcionalmente significativas. La PK-R₁ (L'₄) de células eritroides inmaduras, muestran una baja afinidad por el sustrato cuando se compara con la PK-R₂ (L'₂L₂) y la PL-L, pero sus propiedades reguladoras son más efectivas (Miwa, 1990).

La PK-R es dependiente de K⁺ y Mn²⁺ y exhibe propiedades alostéricas que reflejan su estructura polimérica. Esta forma es muy sensible a la modulación alostérica por la fructosa 1,6-bifosfatasa 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. (1963). Así, la enzima, se puede encontrar en un equilibrio transicional entre dos conformaciones, R=T, relajada y tensada. La forma T no tiene afinidad por K⁺ y muy poca por el PEP y su cinética es sigmoide (coeficiente de Hill de 1,5-2,0), 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-bifosfato, fructosa 2,6-bifosfato y 6-fosfogluconato disminuyen la cooperatividad de la PK-R hacia PEP, porque el equilibrio R = T se desplaza hacia el estado R. Los efectores negativos, ATP y alanina, operan en sentido opuesto. El equilibrio tetrámero-monómero está regulado por la relación FBP/ATP la cual determina la relación asociación-

disociación. La unión del PEP también parece estar influenciada por los residuos tiol e histidina; la fotooxidación de las 3 histidinas, así como la adición de glutatión oxidado, disminuye la afinidad por PEP y la actividad catalítica, y aumenta la inestabilidad por el calor de la forma R de PK. (Ikeda y col., 1997).

I.4.1. Estructura tridimensional de la piruvato quinasa

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 isozimas de piruvato quinasa de varias especies, desde mamíferos a microorganismos. Así, por ejemplo, se conocen las de la especie humana, el gato, conejo, gallo, rata, ratón, sapo, mosca, levaduras, *Lactobacillus* y *Escherichia coli*. 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, son meras conjeturas hasta que la nueva proteína no haya sido objeto de estudios cristalográficos (Branden y Tooze, 1991). Este es un serio vacío en nuestro conocimiento, puesto que sólo se ha determinado la estructuras cristalina de un 6% de las 50.000 proteínas codificadas por genomas de mamíferos,. 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 (Muirhead y col., 1986) y la de músculo de conejo (Larsen y col., 1994). Estos investigadores realizaron un estudio detallado de las estructuras moleculares, mediante mapas de densidad electrónica obtenidos de las enzimas cristalizadas con una resolución de 2,6 y de 2,9 Å, respectivamente. En ambos casos la secuencia de los aminoácidos se obtuvo utilizando cDNA. 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 información estructural, junto con la obtenida mediante mutagénesis, ha permitido acercarse al entendimiento de las relaciones estructura⇌función y, en muchos casos, a interpretar las posibles interacciones entre la proteína y el resto de los componentes celulares.

I.4.2. Lesiones moleculares en la deficiencia piruvato quinasa

La heterogeneidad bioquímica en la deficiencia en PK ha sido encontrada en más de 400 casos descritos en la bibliografía sobre el tema, habiendo sido evaluada una pequeña proporción según los criterios estándar del *International Committee for Standardization in Haematology* (ICSH) (1979; Miwa y col.,1979). No obstante, la interpretación de estos criterios ha sido complicada por la aparición simultánea de isozimas en las células deficientes en PK, y en la mayoría de los casos son compuestos heterocigotos de

dos alelos mutados, en vez de verdaderos homocigotos. También se puede presentar una heterogeneidad adicional, como una consecuencia de la unión de subunidades normales de las cadenas mutadas (Miwa y Fujii, 1985).

Dada las complejas características estructurales y reguladoras de la PK, no es sorprendente que los productos del gen mutado, exhiban una extensa variedad de propiedades bioquímicas que dependen del lugar preciso en el que se produce la lesión molecular y sus efectos sobre la conformación de las enzimas. Las alteraciones que afectan a las propiedades reguladoras así como a la estabilidad y actividad específica, aparecen a menudo en este desorden heterogéneo (Tanaka, 1985a, 1985b).

Entre las alteraciones más comunes se encuentran la inestabilidad de las enzimas, la disminución de la afinidad por el sustrato, PEP, y/o la modificación de la respuesta al activador alostérico, FBP. Otras anormalidades, que se encuentran con menor frecuencia, son el aumento de la sensibilidad a la inhibición por ATP, el descenso de la afinidad por el cofactor, el aumento de la afinidad por el sustrato o la disminución de la síntesis de la enzima. Los comportamientos anormales de las proteínas pueden reflejarse, sencillamente, en una alteración en la migración electroforética, en la variación del punto isoeléctrico, del pH óptimo, de las velocidades de inactivación térmica y/o concentraciones óptimas de cationes. De forma general se puede indicar que la gravedad clínica de las deficiencias PK, se corresponde mejor con las alteraciones en las propiedades bioquímicas que con los descensos de la actividad enzimática medida en condiciones estándar de ensayo. (Va-

lentine y col., 1989; Tanaka, y Paglia, 1975; Miwa, 1990; Lukens, 1993).

I.4.3. El metabolismo de eritrocitos deficientes en piruvato quinasa

Las alteraciones en las funciones celulares por una deficiencia en PK afecta únicamente a los eritrocitos porque éstos no son capaces de compensar el defecto enzimático aumentando la síntesis de la enzima mutada ni utilizando otras rutas alternativas (Kanno y Miwa, 1992).

En 1961 Valentine y col. descubrieron la primera enzimopatía piruvato quinasa en un paciente que sufría anemia hemolítica no esferocítica. Desde entonces se han descrito numerosos casos, debidos principalmente a Marie y col., 1977; Zanella y col., 1989; ; De Medicis y col., 1992; Feng y col., 1993; Baronciani y col., 1995, 1996a, 1996b; Kanno y col., 1991, 1993, 1995, 1997; Lenzner y col., 1997; Zanella y Bianchi, 2000, y portadores de esa deficiencia se han encontrado en todos los continentes.

Los mecanismos precisos que conducen a la destrucción de los eritrocitos con deficiencia en piruvato quinasa no han sido clarificados todavía. No obstante, la inmensa mayoría de los investigadores están de acuerdo sobre que en dichos mecanismos intervienen básicamente dos hechos: el descenso de la concentración de ATP y el aumento de la de 2,3-bifosfoglicerato.

Se ha observado que el incorrecto funcionamiento de las reacciones dependientes de ATP originan una reducción de la concentración intracelular de este compuesto lo que desencadena una serie de procesos que conducen a la hemólisis. Así, las células con

niveles bajos de ATP pierden grandes cantidades de potasio y agua, se deshidratan y se vuelven rígidas. Estos procesos reducen significativamente el flujo glucolítico especialmente en el sistema retículo endotelial, bazo, hígado y médula ósea favoreciendo la destrucción prematura de los eritrocitos (Miwa y Fujii, 1985).

Sin embargo está hipótesis no explica la hemólisis que sufren los pacientes con deficiencia eritrocitaria en PK y con unos niveles de ATP normales o superiores en los eritrocitos. En estas circunstancias la explicación se centra en el aumento de la concentración del 2,3-bifosfoglicerato.

Este aumento se origina porque la reducción de la actividad PK causa, inicialmente, un aumento en la concentración de su sustrato, PEP. Como consecuencia de este hecho, se produce un aumento en las concentraciones intracelulares de todos los metabolitos de la ruta glucolítica por encima del bloqueo, particularmente del 2,3-bifosfoglicerato y 3-fosfoglicerato (Fig. 4). Las concentraciones de este compuesto 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 (presión de O₂ frente a centros ocupados de hemoglobina por el O₂) significativamente hacia la oxigenación de los tejidos.

Concentraciones elevadas de 2,3-bifosfoglicerato pueden también causar efectos deletéreos inhibiendo enzimas que limitan el flujo metabólico de la ruta glucolítica, como la hexoquinasa y la fosfofructoquinasa y de la ruta de las pentosas fosfato, concretamente, la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, la 6-fosfogluconato deshidrogenasa, la transaldolasa y la transce-

tolasa. También inhibe la actividad de la PP-ribosa-P sintetasa la primera enzima de la ruta biosintética de AMP, NAD/ NADH y NADP/NADPH (Tanaka, 1985).

Algunos efectos de estas acciones inhibitorias, como consecuencia de la elevada concentración de 2,3-bifosfoglicerato en los eritrocitos, deben ser similares a los que produce la deficiencia en glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. En los eritrocitos la única fuente de obtener NADPH es mediante las dos reacciones catalizadas por las deshidrogenasas. El hecho fundamental en la deficiencia en G6P deshidrogenasa es la reducción de la concentración de NADPH, lo mismo que produce una deficiencia PK como consecuencia de la inhibición de la enzima por el 2,3-bifosfoglicerato y de la reducción de la síntesis de NADP/ NADPH. En este aspecto, Zerez y Weis (1986) demostraron, en personas con deficiencia eritrocitaria PK, que la primera enzima de la ruta biosintética de estos nucleótidos, la PP-ribosa-P sintetasa, es poco activa *in vivo* debido a la baja concentración de ATP y la alta de 2,3-bifosfoglicerato.

La disminución de la concentración de NADPH produce alteraciones tan graves en el funcionamiento y estructura de los eritrocitos que terminan por provocar su lisis. El NADPH sirve para reducir la forma disulfuro del glutatión a la forma sulfhidrilo, que a su vez actúa como un regulador de grupos sulfhidrilo para mantener en estado reducido los residuos de la hemoglobina y otras proteínas de los eritrocitos. También juega un papel esencial en los mecanismos de desintoxicación, ya que reacciona con el peróxido de hidrógeno y los peróxidos orgánicos, evitando con ello a las células daños

irreparables. Además el glutatión en forma reducida, es imprescindible para mantener la estructura normal del eritrocito. Esta hipótesis se ve reforzada por el hecho de que la anemia hemolítica se agrava en individuos deficientes en PK que sufren estados de infección, de estrés metabólico u oxidativo (Beutler, 1978; 1986).

Durante la maduración de los reticulocitos deficientes en PK, al mismo tiempo que desciende la concentración de ATP, aparece un descenso de la fosforilación oxidativa y un aumento de la viscosidad interna (pérdida de agua y aumento de 2,3-bifosfoglicerato), disminuyendo la deformabilidad y favoreciendo su liberación por los macrófagos del bazo. Por ello, después de una esplenectomía el número de reticulocitos es generalmente muy alto. El mecanismo por el cual los macrófagos detectan una deficiencia en PK en los eritrocitos permanece desconocido (Beutler, 1986).

Se han utilizado modelos matemáticos para investigar los desajustes metabólicos de los eritrocitos en portadores de tres deficiencias PK diferentes sin ninguna influencia de los reticulocitos (Holzhütter y col., 1985; Schuster y Holzhüter, 1995). En estos estudios, los autores confirman también una relación próxima entre el desorden metabólico y el acortamiento de la vida de los eritrocitos. Recientemente, en un excelente trabajo Martinov y col. (2000) utilizando un modelo matemático del eritrocito muy completo y que incluye todas las reacciones de la glucólisis, el metabolismo de los nucleótidos de adenina, el balance iónico y la regulación osmótica del volumen eritrocitario determinaron los valores mínimos críticos de Na,K-ATPasa y los de las actividades de todas las en-

zimas en que el eritrocito pierde su viabilidad. Estos autores demuestran que los valores de la actividad de la fosfofructoquinasa, la glucosa fosfato isomerasa, la triosa fosfato isomerasa o la fosfoglicerato quinasa en eritrocitos de pacientes con anemia hemolítica eran significativamente más altos que los calculados como valores críticos. Sin embargo, los valores de la actividad de la hexoquinasa y de la piruvato quinasa son próximos a los valores críticos calculados, lo que es indicativo de un efecto grave que conduce a la hemólisis de la célula.

La bajas concentraciones de ATP en los eritrocitos con deficiencia PK pueden, y de hecho tienen, otros efectos perjudiciales para la viabilidad de la célula. Así, la membrana celular limita las reacciones que consumen energía, como son es, las de la bomba catiónica y las de la fosforilación de las proteínas de membrana. Por otra parte, el bajo nivel de ATP puede favorecer el flujo de K^+ al exterior y la acumulación de Ca^{2+} en los eritrocitos. Se ha supuesto que el transporte de cationes está relacionado con las propiedades funcionales del dominio N-terminal de la banda 3 (Passow, 1986). La ruptura de esta banda conduce a un acortamiento de la vida media del eritrocito. Se ha demostrado que el Ca^{2+} activa la capaína, la cual degrada la banda 3 y que este proceso aumenta notablemente en una deficiencia PK. La ruptura de esta banda aparece en la región transmembrana, y está asociada con un cambio en la estructura terciaria, iniciando la unión a los anticuerpos IgG y la liberación por macrófagos (Jacobasch y Rapoport, 1996).

I.4.4. Mutaciones en el gen piruvato quinasa

El gen PK-LR se localiza en el brazo largo del cromosoma 1 y en la banda 21 (Fig.7). El cDNA de la PK-LR fue clonado y secuenciado en 1988 (Neubauer y col., 1988). Su tamaño es de alrededor de 8600 pb y comprende 12 exones y 11 intrones (Naguchi y col.,1987; Tani y col.,1988a, 1988b). La cadena polipeptídica de PK-R de eritrocitos humanos tiene 574 aminoácidos de longitud y la de PK-L 543. Esta diferencia de longitud entre las

bilidad a la degradación proteolítica y su diferente movilidad electroforética. Únicamente un 10% de mutantes defectivos en PK son relativamente estables, con una actividad normal o ligeramente disminuida y manteniendo las propiedades alostéricas.

La caracterización bioquímica es el primer paso para identificar variantes genéticas de la PK. El primer caso atribuido a un defecto PK fue descrito en 1961 (Valentine y col.). En España la primera referencia a la deficiencia en PK de eritrocitos fue encontrada

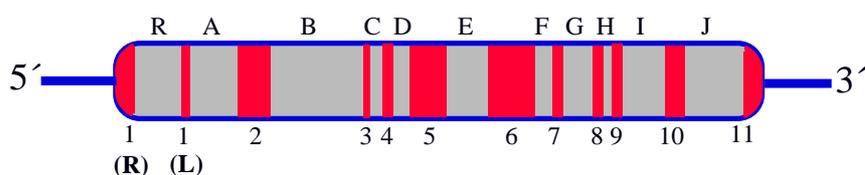


Figura 7. Esquema del gen LR de piruvato quinasa. Los fragmentos de color gris corresponden a los intrones y los de rojo a los exones. La extensión nucleotídica de cada sección es la siguiente: 1(R), 1-230; 2, 231-300; 3, 301-320; 4, 321-487; 5, 488-664; 6, 665-942; 7, 943-1105; 8, 1106-1272; 9, 1273-1436; 10, 1437-1594; 11, 1595-1722.

dos isoenzimas resulta de la diferencia en los transcritos del primer exón de cada isozima, así el primer exón de la PK-R codifica 33 aminoácidos, mientras que el primero de la PK-L codifica únicamente dos. Hasta el momento no se han encontrado mutaciones en el DNA del exón 1(R) ni del exón 1(L).

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 han descrito cambios en la afinidad por el ADP. Las variantes genéticas de la PK pueden ser identificadas por su sensi-

bilidad a la degradación proteolítica y su diferente movilidad electroforética. Únicamente un 10% de mutantes defectivos en PK son relativamente estables, con una actividad normal o ligeramente disminuida y manteniendo las propiedades alostéricas.

La caracterización bioquímica es el primer paso para identificar variantes genéticas de la PK. El primer caso atribuido a un defecto PK fue descrito en 1961 (Valentine y col.). En España la primera referencia a la deficiencia en PK de eritrocitos fue encontrada

en 1977 por Kahn y col. Estos autores, en ese mismo año, identificaron esta deficiencia en seis pacientes relacionados familiarmente (Vives-Corróns, 1977). En la actualidad han sido descritos en la bibliografía más de 400 casos diferentes con deficiencia de piruvato quinasa (Kanno y col.,1994, 1995; Mason, 1999; Zanella y col., 2001). 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 (Mc Mullin, 1999; Martinov y col., 2000).

La multiplicidad clínica de los diferentes casos con deficiencia PK surge

del hecho de que los dos alelos de un paciente estén afectados por mutaciones disfuncionales resultando moléculas de enzima con dos subunidades diferentes cambiadas, esto es un doble heterocigoto. De las 142 mutaciones diferentes identificadas (Zanella y col., 2001) y distribuidas a lo largo de la región codificante, 98 son sustitutivas de un solo aminoácido, 12 por desplazamiento de marco de lectura, 12 en el centro de maduración (*splicing*), 9 sin sentido, 9 pequeñas deleciones e inserciones y 1 que corresponde a una gran deleción (182 bp) (Baronciani y Beuler, 1995; Zanella y Bianchi, 2000),

La mayoría de las mutaciones son esporádicas aunque existen evidencias de que algunas mutaciones tienen relación con la etnia y el territorio. En el hemisferio Este la mutación C1468T es considerada la más común mientras en el Oeste la incidencia más alta de las mutaciones encontradas corresponde a la G1529A y a la 1456T. Este último predomina en América del Norte con una incidencia del 41,6% y en el Centro y Norte de Europa con 41,0%.

La mutación 1456T es la más común en el Sur de Europa, mientras la G1529A es muy rara. Esta mutación, a pesar de los amplios estudios realizados en el Japón, tampoco ha sido encontrada en pacientes de ese país (Kanno y col., 1991; Miwa y Fujii, 1996). Con el fin de conocer si la alta frecuencia de mutación en la posición 1529 es debido a un área especialmente sensible, se han realizado haplotipos de los pacientes utilizando dos polimórficos: el C/A del nucleótido 1705 y el triplete repetido ATT del intrón J. (Kanno y col., 1992a, 1992b, 1993a, 1993b; Lezner y col., 1994). En

todos los casos la mutación G1529A exhibe el mismo haplotipo 1705C y un ATT repetido. Estos resultados apoyan la hipótesis de un origen común simple (Baroncini y Beutler, 1993). La mutación 1529A resulta de una sustitución del aminoácido Arg-Glu en la posición 510. La Arg 510 está localizada en el dominio C de la enzima, la cual se considera importante para el contacto de las subunidades mediante enlaces electrostáticos. Es de destacar que 13 de las sustituciones aminoacídicas corresponden a residuos de arginina y 7 de ellas se encuentran en el dominio C.

Aunque en casi todos los casos las propiedades cinéticas de las variedades genéticas de la PK se modifican, en solo unos pocos los aminoácidos implicados se encuentran próximos al centro activo. Esto es así en la inserción de la Ser en lugar de Cys 401 y en la sustitución Gly275-Arg. La sustitución aminoacídica Ile344-Thr está relacionada posicionalmente con los residuos Lys 313 y Glu 315, los cuales se consideran de gran importancia en la unión del Mn^{2+} o Mg^{2+} (Lakomeck y col., 1994).

Las referencias a deficientes en PK en que la enzima tiene un valor alto de Km por el PEP son escasas, aunque al menos han sido descritas 11 mutaciones diferentes en este grupo. Con la excepción de tres homocigotos (Glu421-Lys; Arg426-Glu; Ala468-Val) todos los otros pacientes se han identificado como heterocigotos compuestos. Es de destacar que alguna de estas mutaciones están localizadas en regiones de los dominios C y A que son los responsables de la unión a la FBP y al K^+ . Puesto que la unión de este catión a PK es esencial para la posterior unión del PEP, la causa me-

diata de la disminución de la actividad en estos mutantes sería la unión defectuosa del catión a la enzima. Una razón para explicar el valor alto de la Km de la enzima por el PEP sería el aumento de la constante alostérica. Este parece ser el caso en la mutación Arg486-Trp. A partir de los estudios cinéticos y los modelos matemáticos (Jacobasch y Rapoport, 1996) se deduce que la constante alostérica está aumentada dos órdenes de magnitud en las moléculas enzimáticas de estas variantes de PK respecto a las de los individuos normales (Demina y col., 1998).

En otros estudios sobre la deficiencia PK se ha observado que la mutación G1529A que causa el cambio de Arg por Gln en la posición 510 estaba presente en 14 pacientes de 18 analizados y que procedían de Inglaterra y Alemania y solamente uno de Eslovenia (Lenzner y col., 1997). Análisis de haplotipos de estos pacientes sugieren un único origen de esta mutación en la población del Norte de Europa. La mutación G1529A, como se ha indicado anteriormente, no ha sido encontrada en pacientes japoneses pero está presente en el 72% de los norteamericanos de raza blanca (Baronciani y Beutler, 1995; Beutler y Gelbart, 2000). Estos datos sugieren que es una mutación relativamente reciente (después de la separación de la población europea y asiática) o de una proliferación diferencial del alelo mutado por deriva genética en diferentes grupos étnicos (Lenzner y col., 1997)

I.4.5. Expresión y regulación del gen de la piruvato quinasa

La gran mayoría de los investigadores están de acuerdo en que para

introducir un gen en células humanas *in vivo* con el fin de paliar una deficiencia hereditaria es esencial conocer la estructura del gen y su regulación.

El promotor del gen PK-LR de eritrocitos humanos, que no se puede considerar un verdadero promotor constitutivo, fue identificado comparando secuencias de DNA genómico clonado con cDNAs específicos y con genes de rata caracterizados previamente (Consler y col., 1989; Noguchi y col., 1987). La expresión transitoria del marcador CAT en células eritroleucémicas bajo el control de varios promotores truncados, demostraron que la secuencia de 270 bp adyacente al extremo 5' de la secuencia codificante era esencial para la actividad del promotor. Esta secuencia contiene varias GATA y CAC que se han descrito que dirigen cooperativamente la transcripción específica en los eritrocitos. El efecto de estos elementos en el gen humano *in vivo* no se conoce todavía pero se han obtenido interesantes resultados en el gen homólogo de rata. Utilizando ratones transgénicos que contienen el gen de rata se ha podido detectar un inductor específico en eritrocitos de 37 Kpb por delante en sentido 5' del lugar donde comienza la transcripción. El sitio ha sido mapeado como un centro hipersensible de nucleasa de hígado fetal y se encontró que el centro de 200 pb del inductor múltiple con elementos GATA y CACC se encontraba unido a proteínas. Estos datos apuntan a que el promotor PK-LR de eritrocitos se asemeja a un promotor específico de tejidos (Lacronique y col., 1995).

I.4.6. Terapia habitual y génica en la deficiencia piruvato quinasa

Se puede afirmar que no existe un tratamiento definitivo para el defecto piruvato quinasa. La terapia que más ha sido utilizada en niños para paliar los efectos de una deficiencia PK, son las transfusiones de sangre cuando los valores de hemoglobina son bajos. Después de la niñez muchos pacientes se adaptan a un nivel compensado de hemólisis que no suele requerir transfusión, a menos que existan otras complicaciones como un estado infeccioso, embarazo u otras condiciones adicionales (Valentine y col., 1985; Gilsanz y col., 1993).

En casos graves de adultos se suele practicar la esplenectomía que en ocasiones permite mejorar el proceso, aunque no se puede predecir el grado de eficacia para un caso particular (Gilsanz, 1997a, 1997b). En niños y en adolescentes también se suele utilizar la esplenectomía. Esta terapia debe aplicarse con cautela ya que no es posible conocer con seguridad la respuesta, y el enfermo, una vez esplenectomizado, se encuentra ante un mayor riesgo de infecciones y de accidentes trombóticos. En las personas esplenectomizadas suele aumentar la concentración de hemoglobina de 1 a 3 g/dl, lo que hace innecesario las transfusiones y el paciente suele crecer y desarrollarse normalmente (Tanaka y Paglia, 1971).

Se han realizado varios estudios con sustancias que modifican la actividad enzimática PK, administrándolos por vía oral o parental, como son: AMP, magnesio, manosa, galactosa, fructosa, adenina, inosina y guanosina. También se han utilizado otros factores estimulantes hematopoyéticos y esteroides. Los resultados obtenidos mediante estos procedimientos han resultado insatisfactorios (Tanaka, 1985).

El argumento de que, mediante transferencia del gen PK a células del sistema hematológico, se pueden paliar los efectos provocados por esa deficiencia enzimática, es el mismo que el utilizado para el trasplante de médula ósea alogénico. Según los casos los síntomas se evitan, se estabilizan o no se alteran, así que no se puede predecir el éxito que tendría la transferencia del gen en las enzimopatías más severas. Aubourg y col., (1990) y Hoogerbrugge y col. (1995) señalaron que el posible mecanismo por el que el trasplante de médula ósea podía aliviar los síntomas en células hematopoyéticas, debería incluir la transferencia de la enzima desde células de la médula ósea normales a células deficientes bien por contacto célula-célula o por liberación de la enzima en el plasma. Recientemente se ha demostrado que el trasplante de médula ósea es eficaz, al menos, en niños. Tamphichitr y col. (2000) consiguieron eliminar los efectos de una enzimopatía PK en un niño de cinco años utilizando dicho procedimiento. El donante fue su hermana con idéntico antígeno HLA y actividad piruvato quinasa normal. Tres años después de la operación el niño tiene un nivel normal de hemoglobina y de actividad PK con ausencia de hemólisis.

Respecto a la transferencia de genes con fines terapéuticos en humanos, es evidente que el procedimiento debe realizarse con un mínimo riesgo y con gran probabilidad de éxito. Para ello tiene que ser convenientemente probado en modelos animales. En el caso de la deficiencia de PK han podido obtenerse modelos animales mediante transgenicidad. Utilizando recombinación homóloga con células de tallo embrionario es posible producir ratones con una mutación puntual en el

lugar deseado y por tanto, en principio, los modelos de ratas con deficiencias enzimáticas resultarían fáciles de obtener sustituyendo los aminoácidos conservados que están alterados. Los modelos de ratones son muy útiles para evaluar los efectos del gen alterado y así ha sido demostrado experimentalmente en el PK-LR (Tani y col., 1994). Estos autores obtuvieron una línea celular mediante transfección retroviral del cDNA de la PK-L humana. La línea celular fue utilizada para transducir células NIH/3T3 de ratón y líneas celulares leucémicas. El mRNA de la PK humana fue detectado en las células transducidas. Posteriormente se intentaron transducir células de médula ósea de rata enriquecidas con células progenitoras a ratones letalmente irradiados. El mRNA correspondiente al gen recombinante humano se detectó en la sangre periférica de los ratones pero a niveles extremadamente bajos (sólo detectable por PCR). Este estudio aunque demuestra la viabilidad del procedimiento deja entrever que queda mucho trabajo por realizar antes de intentar una terapia molecular en la especie humana con suficiente garantía de éxito. Las enzimopatías pueden causar enfermedades severas y los tratamientos actuales todavía son limitados. Ahora que la base molecular de la mayoría de las enfermedades moleculares se está clarificando, se puede comenzar a abordar un conjunto de posibles tratamientos por técnicas de transferencia de genes (Hoogerbrugge y col., 1995).

Cuando solamente las células sanguíneas sufren la principal manifestación de un defecto genético, como es el caso de la PK, hay fundadas esperanzas de que la transferencia de genes a células progenitoras hematopoyéticas

sea efectiva. Naturalmente, como en todas técnicas de transferencia de genes, existe todavía un largo camino por recorrer hasta desarrollar un procedimiento seguro y una metodología eficaz y sencilla que permita obtener unos resultados satisfactorios.

La deficiencia en piruvato quinasa es la enzimopatología hereditaria más frecuente en la ruta glucolítica de los eritrocitos, que se origina como consecuencia de una mutación genética, y que causa una anemia hemolítica no esferocítica. En la especie humana se han descrito dos clases de genes piruvato quinasa, PK-LR y PK-M, que codifican, cada uno, dos tipos de isozimas diferentes. El PK-LR codifica la isozima L que se encuentra principalmente en hígado, riñones e intestino delgado, y la R que es específica de los eritrocitos. El PK-M codifica la M_1 que es la isozima mayoritaria en el músculo esquelético, corazón y cerebro y la M_2 que se encuentra en los tejidos fetales y en la mayoría de los tejidos de los adultos. El gen PK-LR se encuentra formado por doce exones, siendo el primero y el segundo los que transcriben específicamente los mRNA del tipo R o L con el concurso de dos diferentes promotores específicos de tejido.

En los tejidos y células del organismo humano la mutación en los genes que codifican las diferentes isozimas con actividad piruvato quinasa no se traduce en ningún síntoma patológico apreciable debido a la ubicuidad de los tipos L, M_1 y M_2 . Sin embargo, en los eritrocitos, una mutación en el gen P-KLR puede producir una isozima defectiva del tipo R, que al ser exclusiva de estas células cursa en una anemia hemolítica. La catálisis imperfecta de esta enzima clave en la ruta glucolítica origina en los eritrocitos, simultáneamente, una elevada concentración de 2,3-bisfosfoglicerato y una disminución de la producción de ATP, los cuales son necesarios que permanezcan a niveles normales para regular el proceso de unión hemoglobina-oxígeno y mantener la forma y estructura de las células.

Los procedimientos para descubrir las

variantes deficientes en piruvato quinasa han sido normalizadas por el *International Committee for Standardization in Haematology* (ICSH). Sin embargo, la interpretación de los valores de las propiedades bioquímicas de las enzimas mutadas, se puede ver enmascarada o confundida por la inestabilidad parcial de las enzimas, por la alta frecuencia relativa de los heterocigotos que originan enzimas con diferentes propiedades o por el diferente metabolismo energético que existe entre los pacientes debido a la edad, a una enfermedad añadida o a un tratamiento terapéutico basado en medicamentos. Además, los pacientes con anemia hemolítica, requieren con frecuencia transfusiones de sangre que impiden la caracterización bioquímica de los mutantes porque aportan eritrocitos y leucocitos que contienen el producto del gen normal.

Actualmente estos problemas han podido ser superados utilizando métodos de análisis molecular. Mediante la clonación del gen tipo LR del cDNA de piruvato quinasa se puede estudiar directamente las mutaciones en la enzima a nivel de DNA y obtener información acerca de los defectos moleculares.

La deficiencia piruvato quinasa se encuentra muy extendida en el planeta, habiendo países y regiones en que ha sido bien investigada. Este hecho contrasta con los pocos estudios realizados en nuestro país. Sería interesante obtener información acerca de la naturaleza y la frecuencia de las mutaciones existentes en una población tan heterogénea genéticamente como la española.

Por ello, nuestro objetivo principal ha sido **la identificación y caracterización de mutantes en el gen PK-LR responsables de fenotipos deficientes de piruvato quinasa en eritrocitos humanos.**

III.1 Reactivos

Para la preparación de disoluciones tampón y otras disoluciones se utilizaron reactivos (grado analítico) de las casas Sigma, Merck, Probus y Analema. El agua que se usó en los medios de cultivo, disoluciones y tampones fue destilada y desionizada.

El xilencianol, el EDTA, el Trizma base (TIRS) y el SDS se obtuvieron de la casa Sigma.

Las columnas de purificación de DNA, las enzimas de restricción y la Taq. DNA 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.

La agarosa y el bromuro de etidio de Boehringer Mannheim.

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™ de Clontech.

El Kit para la extracción de RNA de Qiagen.

El ladder-100™ de Pharmacia-Biotech.

La T4 DNA ligasa y vector pGEM-T de Promega.

III.2 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. Las muestras de san-

gre fueron obtenidas de pacientes y familiares en las condiciones adecuadas. Los análisis hematológicos y las observaciones clínicas de los pacientes fueron realizados por el Servicio de Hematología citado anteriormente. La deficiencia en piruvato quinasa fue diagnosticada determinando la actividad de la enzima 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.

III.3 Aparatos utilizados

Termocicladores automáticos : PCR system PERKIN ELMER 2400 y EPENDORF Mastercycler gradient.

Microfugas: Sorvall (DUPONT), Microspin12 y Biofuge HERAEUS.

Centrifugas: BECKMAN J2-21 y CENTRIKON T-42K.

Cabina : Microflow Laminer Flow Cabinet.

Baño de agua: Pharmacia LKB. Multitemp II.

Desionizador-purificador de agua: ELGASTAT UHQPS.

Cámara fotográfica: KODAK. Digital science.

Transiluminador: PHARMACIA-BIOTECH. 2001 Macrovue.

Cubetas y fuentes de electroforesis: PHARMACIA-BIOTECH.

III.4 Procedimientos generales

Para todas las manipulaciones de la sangre, extracción de DNA y RNA se

utilizaron guantes y condiciones estériles en la campana de flujo laminar.

El material de vidrio y plástico de polipropileno se esterilizó a 121°C y 1,2 atmósferas de presión durante 20 minutos. El plástico estéril de poliestireno y polivinilo se deshechó después de usado. La esterilización de agua y de los tampones, cuando fue necesario, se realizó en autoclave (20 minutos, 121°C, 1,2 atmósferas).

Medios de cultivo y otras disoluciones y compuestos que se descomponen a temperatura superior a la normal se esterilizaron a través de membranas Millipore de 0,22 µm.

III.4.1. Extracción de DNA de células nucleadas humanas.

Se han utilizado las siguientes disoluciones tampón:

Tampón de lisis: Tris-HCl (pH 8,2), 10 mM; NaCl, 0,4 mM y Na₂EDTA, 2 mM

Tampón TE: Tris-HCl pH 7,5, 10 mM y Na₂EDTA, 0,2 mM

El método seguido ha sido, fundamentalmente, el descrito por Miller y col. (1988). Las células nucleadas (leucocitos) obtenidas después de centrifugar aproximadamente 5 ml de sangre a 2.500 r.p.m. durante 5 minutos, fueron resuspendidas en 3 ml de tampón de lisis en un tubo de centrifuga de polipropileno de 15 ml de capacidad. El lisado celular fue digerido con 0,2 ml de SDS al 10% y 0,5 ml de una disolución de proteasa K (1 mg de proteasa K en 1% de SDS y 2 mM de Na₂EDTA) a 37°C durante toda la noche.

Una vez que la digestión se completó se añadió 1 ml de disolución saturada de NaCl (aproximadamente 6 M) e inmediatamente el tubo se agitó fuertemente durante 15 segundos y se centrifugó a 2.500 r.p.m. durante 15 minutos. El sobrenadante, que contiene el DNA, fue transferido cuidadosamente a otro tubo de polipropileno, al que se agregó 2 ml de etanol absoluto, se tapó y se agitó invirtiendo el tubo varias veces hasta que se observó que el DNA había precipitado. El DNA, precipitado en formas filamentosas, se recogió cuidadosamente con una espátula o pipeta y se transfirió a un microtubo de centrifuga que contenía 1,5 ml de tampón TE. El DNA se incubó durante 2 horas a 37°C, tiempo suficiente para su disolución, antes de proceder a su determinación cuantitativa. La calidad del DNA extraído se valoró mediante electroforesis en geles de agarosa a 10,8% en TAE 1X.

III.4.2. Extracción de RNA total de sangre entera

Para la obtención del RNA 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*. En un tubo de centrifuga de 25 ml de capacidad se agrega 7,5 ml de tampón de *Erythrocyte lysis* (EL) y 1 ml de sangre. La mezcla se introduce en hielo durante 10-25 minutos procurando agitarla suave y manualmente dos veces durante el tiempo de incubación. La lisis de los eritrocitos se puede observar

porque, en ese período de tiempo, la mezcla se vuelve transparente; si no fuera así la incubación en hielo se puede prolongar durante otros 20 minutos.

Posteriormente se centrifuga a 400xg durante 10-15 minutos a 4°C. El sobrenadante con los eritrocitos se descarta y al precipitado, que contiene los leucocitos, se le agrega 2 ml de tampón EL. Las células se resuspenden con ayuda de una pipeta y la suspensión se vuelve a centrifugar a 400xg, 10 minutos a 4°C. Nuevamente se descarta el sobrenadante teniendo la precaución de eliminar la mayor cantidad posible de él, pues interfiere con las columnas de RNeasy y reduce notablemente el rendimiento del proceso. Posteriormente, al precipitado, se le añaden 600 µl tampón de RNeasy *Lysis* (RTL) y la mezcla se agita mediante pipeta o en un agitador tipo Vortex, y se deposita directamente en una columna de QIAshredder que tiene aplicado un tubo colector de 2 ml de capacidad. Se centrifuga en una microfuga 2 minutos a 12.000 r.p.m. y se recoge el lisado homogenizado al que se le añade 350-600 µl de etanol al 70%. El precipitado se resuspende utilizando una pipeta y la suspensión, cuyo volumen no debe exceder de 700 µl, se aplica a la columna de RNeasy, centrifugando a 10.000 r.p.m. durante 15 segundos. Posteriormente se aplica a la columna de RNeasy 700 µl de tampón RW1 y se centrifuga a 10.000 r.p.m. durante 15 segundos, descartando el líquido eluido y el tubo colector.

Se aplica un tubo colector nuevo a la columna de RNeasy y se añaden a la columna 500 µl de tampón RPE, centrifugando a 10.000 r.p.m. durante

15 segundos. Se descarta el eluato y se vuelve a colocar el tubo colector. Se aplican 500 µl de tampón RPE a la columna de RNeasy y se centrifuga a 12.000 r.p.m. durante 2 minutos para secar la membrana de la columna. Debe tenerse cuidado de que la membrana se mantenga lo más seca posible, ya que el etanol puede interferir en procesos posteriores, y de que el extremo inferior de la columna no contacte con el líquido eluido. Se coloca en la columna de RNeasy un nuevo tubo colector de 1,5 ml y se aplican directamente a la membrana de la misma 30-50 µl de agua libre de RNasa. Se centrifuga a 10.000 r.p.m. durante 1 minuto y se recoge el líquido eluido. El proceso se repite dos veces y los eluatos se recogen en un tubo estéril.

III.4.3. Análisis electroforéticos

El procedimiento seguido ha sido el descrito por Sambrook y col. (1989).

Las disoluciones y tampones utilizados han sido:

Tampón TAE: Tris-acetato pH 9,1, 40 mM y EDTA, 1 mM.

Tampón de muestra: Azul de bromofenol, 0,25%; Xilencianol, 0,25%, Glicerol, 30% en agua destilada.

Disolución de bromuro de etidio: Se disuelve 1 g de bromuro de etidio en agua agitando durante varias horas. La disolución se debe guardar al amparo de la luz y a temperatura ambiente.

Para la preparación de los geles de agarosa se disuelven 2 ml de TAE en 98 ml de agua y se mezclan con una cantidad de agarosa que varía según el

tamaño de los fragmentos de DNA que se deseen visualizar (Tabla 3).

Tabla 3. Relación del porcentaje de agarosa y el margen de resolución de los fragmentos de DNA	
Agarosa (%)	Resolución (kb)
0,3	1,7 -- 7,0
0,5	0,7 -- 4,5
0,8	0,4 -- 2,0
1,0	0,3 -- 1,0
1,2	0,2 -- 8,0
1,5	0,2 -- 6,0

La mezcla se calienta a 60°C, preferentemente en un horno microondas, hasta que la agarosa se haya disuelto, y, después de esperar unos minutos hasta que la temperatura descienda aproximadamente a 45°C, se agregan 3 µl de la disolución de bromuro de etidio, se agita y se vierte lentamente sobre el molde con el peine incorporado. Una vez solidificado el gel, éste se introduce en la cámara de electroforesis, se agrega buffer de electroforesis hasta cubrir el gel (aproximadamente 1 mm) y se colocan las muestras de DNA en los pocillos de carga previamente diluidas con 1-2 µl de tampón de muestra.

Posteriormente se cubre con la tapa la cámara electroforética y se conectan los electrodos de la fuente de alimentación. Se aplica un voltaje de 3-5 V/cm y el proceso se da por finalizado cuando la mancha correspondiente al azul de bromofenol emigra del gel (aproximadamente 30 min).

Los geles se examinan a la luz ultravioleta donde se visualizan los fragmentos de DNA y, si es necesario, se fotografian.

III.4.3.1 Marcadores de tamaños de fragmentos de DNA

λ-Hind III. Es un marcador que se utiliza para visualizar fragmentos de DNA con tamaños superiores a 500 pb. Para ello se toman 20 µl del DNA del fago λ, 1,5 µl de tampón de la enzima de restricción, 2 µl de la enzima Hind III y se añade 23 µl de agua destilada.

La disolución se mantiene a 37°C hasta la completa digestión, añadiéndose a continuación 300 µl de agua destilada y 50 µl de tampón de carga. El preparado se puede almacenar a -20°C hasta su utilización.

Ladder-100™. Es un marcador que se utiliza para visualizar fragmentos de DNA de tamaños superiores a 100 pb. La preparación es una mezcla de fragmentos de DNA cuyo tamaño se diferencia en 100 pb. La cantidad de fragmento del tamaño de 800 pb es doble que el del resto, para facilitar la identificación de fragmentos de DNA de tamaño igual o superior.

III.4.4 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; (NH₄)₂SO₄ 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 MgCl₂ es de 50 mM.

Disoluciones de cebadores (*primers*): Cada disolución contiene un cebador a una concentración de 150 mg/ml.

Los cebadores, utilizados para amplificar los once exones, se diseñaron en zonas flanqueantes no codificantes y sus secuencias nucleotídicas son las siguientes:

EXON 1
Dir. 5' TATTCCATGGTCCCGCAG 3'
Inv. 5' GGCTCCTAGTTTTACCCCTC 3'

EXON 2
Dir.. 5'GCATGGGGAGGAAGGGCAGG 3'
Inv. 5'ATAGGCCCTGTGTGGCTGCA 3'

EXON 3
Dir. 5'GGTTGCCTCTCATGTTCTGGG 3'
Inv. 5'GGAAGGTGGCCAGGACCTCG 3'

EXON 4
Dir.. 5'CGAGGTCCTGGCCACCTTCC 3'
Inv. 5'CGGCCGCCTTCCGGCCCTG 3'

EXON 5
Dir. 5'GCAGGGGCGGGTCCCGGACT 3'
Inv. 5'TGCCAGCGCACGGATGTGG 3'

EXON 6
Dir. 5' CAACTGTGCCCCGTCTCA 3'
Inv. 5' GTGATGGGGAATAGCGACAG 3'

EXON 7
Dir. 5'CACCTTCTTCTCCTGCCTG 3'
Inv..5'CAGGTGTCCCTAAAACCCAC 3'

EXON 8
Dir. 5'GTAGCTTGGGCAGGGTCCCC 3'
Inv..5'GGCACTGGGGTATGGAAGG

EXON 9
Dir. 5'CCTTCCATACCCCAGTGCCC 3'
Inv.5'GCCACCCCTGACCCAAAGC 3'

EXON 10
Dir. 5'CTCGTTCACCACTTTCTTGC 3'
Inv.5' GGGGCTCCTGATACAAATGG 3'

EXON 11
Dir. 5'TGTGAGCCACCACACCTGTC 3'
Inv. 5'CGAAGGGGCTAGATGACAGT 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 MgCl₂ dependieron de las condiciones del programa y de la clase de enzima utilizada (Tabla 4). En todas las series de ensayos se utilizó un tubo en blanco que contenía todas las sustancias de la reacción salvo el cebador y que fue sometido a los mismos procesos que los de las muestras.

El programa de amplificación por PCR consistió en las siguientes pasos o etapas:

1^a. 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 DNA.

Las etapas 2^a, 3^a y 4^a se repitieron durante 40 ciclos.

El proceso de PCR se controla sometiendo a electroforesis sobre geles de agarosa al 1,5%, 5µl de muestra de cada uno de los tubos, utilizando como marcador el Ladder-100.

2^a. Temperatura: 94°C. Tiempo: 30 seg. Proceso: Desnaturalización de la doble hélice de DNA en el proceso cíclico.

3^a. Temperatura: (variable, según Tabla). Tiempo : 20 seg. Proceso:

Hibridación específica entre las cadenas del cebador y las de DNA.

4^a. Temperatura: 72°C. Tiempo: 20 seg. Proceso: Elongación de las cadenas sintetizadas de nuevo.

5^a Temperatura: 72°C. Tiempo: 3 min. Proceso: Elongación final

6^a. Temperatura: 4°C. Tiempo: ∞ Proceso : Mantenimiento.

Tabla 4. Condiciones particulares de amplificación por PCR de los exones del gen PK-LR

Exón N°	Polimer. Taq	Temper. Hibrid.	[Mg ²⁺] (mM)
1	Biotools	51°C	1,0
2	Biotools	53°C	1,0
3	Biotools	56°C	1,5
4	Biotools	56°C	1,5
5	Biotools	47°C	1,5
6	Biotools	51°C	1,5
7	Biotools Gold	56°C	1,0 1,25
8	Biotools	56°C	1,5
9	Gold*	58°C	1,0
10	Biotools	48°C	1,5
11	Biotools	51°C	1,5

- Con el cebador del exón n°9 la temperatura y el periodo de extensión fueron 72°C y 10 segundos

III.4.5 Inserción y unión de los productos de PCR al vector pGEM® -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® -T. Este elemento tiene la ventaja de poseer dos timinas que permiten la unión con los extremos adenilados de los fragmentos de DNA procedentes del PCR en una

región que conlleva dianas para varios enzimas de restricción (Fig. 8) y el gen lac Z. El vector también contiene otra región que le confiere resistencia a ampicilina.

Las disoluciones y tampones que se utilizaron fueron:

Tampón de unión T4 DNA ligasa: Tris-HCl (pH 7,8), 60 mM; MgCl₂, 20 mM; DTT, 20 mM y ATP, 1 mM.

Disolución de T4 DNA ligasa: Contiene 1 unidad Weiss de enzima/μl en disolución tampón de Tris-HCl 10 mM (pH 7,4); KCl, 50 mM; DTT, 0,1 mM; EDTA, 1 mM y glicerol al 5%.

Disolución vector pGEM®-T

Disolución vector control pGEM®-T

El procedimiento seguido ha sido el descrito en el Technical Bulletin, que acompaña al kit de PROMEGA y que consta de los siguientes pasos:

1°. Centrifugar brevemente (un pulso) en una microfuga los tubos del kit que contiene el vector pGEM®-T (pGEM®-T vector) y el vector control pGEM®-T (pGEM®-T Vector Control) con el fin de que los contenidos se concentren en el fondo de los tubos.

2°. Preparar la mezcla de reacción que contiene: Tampón de unión T4 DNA ligasa, 2,5 μl; disolución vector pGEM®-T, 0,5 μl; disolución conteniendo los productos de la reacción de PCR, 1,5 μl y disolución de T4 DNA ligasa, 0,5 μl. La reacción control contiene todos los reactivos salvo los productos de la reacción de PCR que son sustituidos por la disolución vector control pGEM®-T, 1,5 μl.

3°. La reacción se incubaba toda la noche a 4°C

III.4.6 Transformación de células de *Escherichia coli*

El material utilizado en esta técnica ha sido:

Células de *Escherichia coli* JM109. Estas células son *High Efficiency Competent* y su genotipo es recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, relA1, supE44, $\Delta(\text{lac-proAB})$, [F⁺, traD36, proAB, lacIqZ Δ M15]

Disolución de IPTG: Disolver 1,2 g de IPTG en un volumen final de 50 ml de agua (0,10 M). La disolución se esteriliza por filtrado y se almacena a 4°C.

Disolución X-Gal: Disolver 100 mg de 5-bromo-cloro-3-indolil- β -D-galactósido en 2 ml de N-N'dimetilformamida.

Medio de cultivo LB: Añadir a 1 litro de agua destilada, 10 g de Bacto®-triptona, 5 g de extractos de levadura Bacto® y 5 g de NaCl. Ajustar el pH a 7,0 y esterilizar en autoclave.

Medio de cultivo TYP: Añadir a 1 litro de agua destilada, 16 g de Bacto®-triptona, 16 g de extractos de levadura Bacto®, 5 NaCl y 2,5 g de K₂HPO₄.

Placas de LB con ampicilina: Añadir 15 g de agar a 1 litro de medio LB. Esterilizar. Dejar que el medio se enfríe a unos 50°C, y adicionar ampicilina a una concentración final de 100 $\mu\text{g/ml}$. Agitar lentamente y verter en placas de Petri unos 25 ml del medio en cada una. Dejar que el medio se solidifique. Las placas se pueden almacenar una semana a temperatura ambiente ó a 4°C durante un mes.

Placas de LB con ampicilina/IPTG/X-Gal: La preparación de estas

placas es similar a la de las placas con ampicilina salvo que en éstas se añade al medio IPTG y X-Gal, a una concentración final de 0,5 mM y 80 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Otra forma alternativa de preparar estas placas ha sido esparciendo por la superficie de cada placa con ampicilina, 100 μl de la disolución de IPTG y 20 μl de la disolución de X-Gal.

El procedimiento seguido para la transformación ha sido el descrito en el *Technical Bulletin* de Promega y que consta de los siguientes pasos:

1°. Centrifugar la disolución que contiene el vector DNA ligado-pGEM®-T. Tomar cantidades alícuotas de 2 μl del fondo del tubo y llevarlos a tubos esteriles de microfuga de 1,5 ml de capacidad, introduciéndolos en hielo.

2°. Descongelar la suspensión de células de *E.coli* colocando el tubo en un baño de hielo (aproximadamente 5 minutos). Tomar cuidadosamente muestras de 50 μl de la suspensión y agregarlas a los tubos que contienen el vector.

3°. Agitar los tubos suavemente por inversión y colocarlos en el baño de hielo durante 20 minutos.

4°. Extraer los tubos y someterlos a un "choque térmico" en un baño de agua a 42°C exactamente y durante 45-50 segundos. Inmediatamente introducir los tubos en hielo durante 2 minutos.

5°. Añadir medio LB a los tubos según la relación: 450 μl si el inserto de los productos de PCR es, aproximadamente, de 1.500 pb y 1,4 ml si es, aproximadamente, de 500 pb. Mezclar por inversión suavemente e incubar 1 hora a 37°C.

6°. Posteriormente, esparcir 50 µl de la mezcla de transformación por la superficie de dos placas y otros 100 µl en otras dos y almacenar la mezcla sobrante en el congelador a 4° C.

7°. Incubar las placas a 37°C durante 24 horas. Pasado este tiempo seleccionar las colonias de color blanco que son las que con mucha probabilidad contiene el inserto.

III.4.7 Aislamiento de los plásmidos conteniendo los insertos de DNA

El aislamiento de los plásmidos conteniendo los insertos fue realizado mediante dos métodos. Generalmente, en primer lugar se realizaba el método descrito en el *Manual Cloning* (Sambrook et al. 1989) que permite de forma rápida obtener plásmidos y, posteriormente, el descrito en el manual de Boehringer Mannheim que permite obtener los plásmidos con mayor grado de pureza.

A) El método descrito por Sambrook y col (1989) requiere los siguientes tampones:

Disolución I: glucosa, 50 mM, Tris-HCl (pH 8,0), 25 mM y EDTA 10 mM. Preparar 100 ml y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Disolución II: NaOH 0,2 mM y SDS al 1%. La disolución se prepara momentos antes de utilizarla.

Disolución III: 60 ml de acetato potásico 5 M, 11,5 ml de ácido acético glacial y 28,5 ml de agua.

El procedimiento, que es una modificación de los métodos de Birnboim y Doly (1979) y de Ish-Horowicz y Bur-

ke (1981), consta de los siguientes pasos:

a. En un frasco de 15 ml se agregan 2 ml de cultivo LB y se inocula la bacteria con el plásmido dejando crecer toda la noche a 37°C con agitación.

b. Tomar 1,5 ml del cultivo y llevarlo a tubo de microfuga. Centrifugar a máxima velocidad durante 30 segundos. Almacenar el resto del cultivo a 4°C.

c. Extraer mediante aspiración el medio dejando el precipitado lo más seco posible.

d. Resuspender el precipitado en 100 µl de la disolución I mantenida en baño de hielo y agitar fuertemente en un Vortex.

e. Agregar 200 µl de la disolución II recién preparada. Tapar el tubo y mezclar los contenidos por inversión durante 5 segundos. Dejar estar el tubo en hielo.

f. Añadir 150 µl de la disolución III enfriada en baño de hielo. Tapar el tubo y agitarlo en posición invertida en el Vortex durante 10 segundos. Dejar el tubo en hielo durante 3-4 minutos.

g. Centrifugar a la máxima velocidad durante 5 minutos a 4°C en una microfuga. Extraer el sobrenadante por aspiración. Dejar el tubo con el precipitado en una posición invertida sobre un papel de filtro para favorecer un secado completo y eliminar las gotas de las paredes interiores del tubo.

h. Lavar el precipitado, que contiene el DNA de doble hebra, con 1 ml de etanol. Centrifugar a velocidad máxima durante 5 minutos. Descartar el sobrenadante y secar el tubo como se describe en el paso g. Dejar secar el precipitado al aire durante 10 minutos

i. Redissolver el precipitado en 50 μ l de TE (pH 8,0) conteniendo RNAasa de páncreas libre de DNAasa a una concentración de 20 μ l/ml. Agitar brevemente en el Vortex y guardar a -20° C.

B) El método descrito en el manual “*High Pure Plasmid Isolation*” de Boehringer Mannheim, requiere los siguientes tampones:

Tampón de suspensión: Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM y EDTA, 10 mM.

Tampón de lisis: NaOH, 0,2 M y SDS al 1%.

Tampón de unión: Cloruro de guanidina, 4 M y acetato potásico (pH 4,2), 0,5 M.

Tampón de lavado I: Cloruro de guanidina, 5 M y Tris-HCl, (pH 6,6) 20 mM.

Tampón de lavado II: Cloruro sódico, 20 mM y Tris-HCl, 2 mM.

Tampón de elución: Tris-HCl (pH 8,5), 10 mM y EDTA, 1 mM.

Los tres primeros pasos a, b y c , de este método son idénticos al anterior; el procedimiento continua de la siguiente manera:

d. Resuspender el precipitado en 250 μ l de tampón de suspensión.

e. Añadir 250 μ l de tampón de lisis, mezclar suavemente y dejar estar 5 minutos a temperatura ambiente.

f. Añadir 350 μ l de tampón de unión mantenido en hielo, mezcla suavemente por inversión, 3-6 veces, y dejar en hielo durante 5 minutos. La disolución se enturbia y flocula.

g. Centrifugar durante 10 minutos a la máxima velocidad en una microfuga.

h. Ajustar el tubo colector al tubo con el filtro *High Pure*, colocar el sobrenadante en el reservorio superior y centrifugar en una microfuga a la máxima velocidad durante 30-60 segundos.

i. Descartar el eluato. Añadir 500 μ l de tampón de lavado II y centrifugar a la máxima velocidad durante 30-60 segundos.

j. Descartar el eluato. Añadir 700 μ l de tampón de lavado II y centrifugar nuevamente a la máxima velocidad durante 30-60 segundos.

k. Descargar el eluato. Centrifugar a la máxima velocidad durante 30-60 segundos para eliminar cualquier residuo del agua de lavado.

l. Quitar el tubo colector y colocar uno nuevo de 1,5 ml de capacidad. Añadir 100 μ l de tampón de elución ó 100 μ l de agua y centrifugar a la máxima velocidad durante unos 30 segundos.

III.4.8. Aislamiento y caracterización de los insertos plasmídicos.

Para aislar y caracterizar los fragmentos de DNA insertados en los plásmidos, los vectores pGEM[®]-T fueron digeridos con dos enzimas de restricción cuyas secuencias objetivo se localizan en el sitio de multiclonación. Los productos de la digestión se sometieron a electroforesis.

El Tampón utilizado y las disoluciones fueron:

Tampón de reacción: Tris-HCl (pH 7,9), 50 mM; MgCl₂, 10 mM; NaCl, 100 mM y DTT, 1 mM.

Disolución Pst I: Contiene 20U/ μ l de enzima Pst I en tampón H formado por Tris-HCl (pH 7,4), 10 mM; NaCl, 200 mM; EDTA, 0,1 mM; DTT, 1 mM; Triton-X, 0,15%; BSA, 200 μ g/ml y glicerol 50%.

Disolución Sph I: Contiene 750 U/ml de enzima Sph I en tampón K que está formado por Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM; KCl, 100 mM; EDTA, 0,1 mM; BSA, 0,01 % y glicerol al 50%.

Se prepara una premezcla que, para 25 ensayos, contiene: Tampón de reacción, 25 μ l; disolución de Pst I, 12,5 μ l; disolución de Sph I, 12,5 μ l; RNAasa (10 mg/ml), 6,25 μ l y agua 68,7 μ l. La mezcla de reacción contiene, en cada tubo de ensayo, 5 μ l de la premezcla y 5 μ l del DNA plasmídico con el inserto. La reacción se incubó a 37°C durante toda la noche. A la mañana siguiente se comprueban los ensayos sometiendo cada producto de la reacción de digestión a electroforesis sobre geles de agarosa al 1,5 %.

III.4.9 Secuenciación automática de DNA

El procedimiento de secuenciación de DNA fue realizado con un secuenciador automático (ALF-Pharmacia-Biotech®) y según el procedimiento descrito por Sanger y col. (1977). El oligonucleótido cebador correspondiente a la secuencia del polilinker del plásmido se marca en su extremo 5' con una substancia fluorescente y alargado mediante la T7 DNA polimerasa en cuatro reacciones independientes cada una en presencia de un

2',3'didesoxinucleótido diferente (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP). Muestras de las reacciones son aplicadas a geles de poliacrilamida al 6%, con urea 7 M y sometidas a electroforesis. Después de este proceso, las bandas de DNA se localizan porque emiten fluorescencia al ser excitadas por una emisión láser en sentido perpendicular al plano del gel. La fluorescencia es captada por fotodetectores, digitalizada y procesada en un ordenador.

III.4.10. 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 (1998) con difracción de rayos X sobre las enzimas homólogas cristalizadas de músculo de conejo y de gato. Las secuencias corregidas de los cDNA del gen PK-LR fue alineada con la secuencia derivada de las estructuras PKM utilizando el programa "Alignment of Multiple Protein Sequences" (AMPS) (Barton, 1990).

Los programas utilizados en el estudio de la estructura, la localización de las mutaciones y los efectos locales de las sustituciones fueron el RasMol v.2.6 y el Swiss Model (SwissPdb Viewer v.3.1).

IV.1 Las mutaciones en piruvato quinasa y sus consecuencias fisiopatológicas

IV. 1. 1. Manifestaciones clínicas de pacientes defectivos en piruvato quinasa.

En la Tabla 5 se muestran los datos hematológicos y las observaciones clínicas de 10 pacientes con anemia hemolítica de edades comprendidas entre los 7 y 59 años, que fueron proporcionados por el Servicio de Hematología del Hospital 12 de Octubre (INSALUD, Madrid) Se puede observar en todos los pacientes un aumento del número de reticulocitos y una disminución (excepto en el nº 4) 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 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 eran sensiblemente inferiores a los normales, permitió a los

clínicos, que nos proporcionaron las muestras, efectuar un diagnóstico previo de que la anemia era consecuencia de la deficiencia en la enzima piruvato quinasa.

Los datos de la Tabla 5 han sido obtenidos a partir de muestras de sangre de pacientes al ingresar éstos en el centro hospitalario, previas a posibles transfusiones. Los análisis están basados en los métodos recomendados por el Comité Internacional para la Estandarización en Hematología (ICSH) para la caracterización de pacientes con deficiencia en piruvato quinasa (Miwa y col., 1979). La aplicación de estos métodos, basados en la determinación de parámetros bioquímicos y manifestaciones clínicas, ha permitido identificar más de cuatrocientos casos con deficiencia en dicha enzimopatía (Zanella y col., 2001). 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, y tampoco el que mayor actividad tiene (nº 8) los síntomas más leves. Estos datos están de acuerdo con los obtenidos por otros investigadores (Wintrobe, 1983; Miwa y col.,1993) y que 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 a las diferentes propiedades químico-físicas y catalíticas de las variantes deficientes en piruvato quinasa. (Gilsanz, 1996a, 1996b), 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 la

mas frecuente de las anemias hemolíticas por deficiencia enzimática en los eritrocitos (Baronciani y col., 1996a, 1996b). El defecto aparece en todo tipo de poblaciones y se suele acompañar de ictericia y esplenomegalia (Kanno, 1992; Baronciani y Beutler, 1993; Zanella y col., 1997; Lenzner y col., 1997 y Zarza y col., 1998). España, en un amplio estudio realizado en 1979 por García y colaboradores sobre una muestra de 2.129 personas, se encontró que la frecuencia con que aparece la deficiencia piruvato quinasa es del 0,24%.

Según se observa en la Tabla 5 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. Así, siete de los pacientes muestran anemia crónica, siendo necesario, en dos de ellos (nº 1 y nº 8) transfusiones de sangre y esplenectomía. En los tres restantes 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 hipoplásia eritroide debidos a infecciones como parvovirus B-19 y a mujeres en gestación (Gilsanz, 1996a, 1996b).

En la Tabla 6 se muestran algunos datos hematológicos de los familiares mas cercanos de los pacientes estudiados en la Tabla 5. Al ser la deficiencia de PK de carácter recesivo los valores de la concentración de hemoglobina se encuentran dentro de los límites considerados normales lo cual es un índice de la ausencia de anemia. En la tabla se pone de manifiesto que es necesario presentar los dos alelos mutados, ya que ninguno de los pacientes cursa con dicha enfer-

medad a pesar de que los valores de la actividad enzimática se encuentren, en algunos casos, claramente disminuidos respecto a los normales.

Tabla 6. Datos hematológicos de los familiares relacionados con pacientes de la tabla 5

Relación familiar	Hb (g/dL)	Reticuloc. (x 10 ³ /μL)	Act. PK (U.I./g Hb)
Padre 2	N.D.	N.D.	8,7
Madre 2	N.D.	N.D.	6,4
Padre 3-4	13,5	N.D.	6,21
Madre 3-4	N.D.	N.D.	5,9
Padre 5	14,8	254	6,6
Madre 5	15,2	145	18,6
Padre 6	N.D.	N.D.	12,8
Madre 6	N.D.	N.D.	11,5
Padre 7	15,4	N.D.	N.D.
Madre 7	13,4	N.D.	N.D.
Padre 8	16,7	6	N.D.
Madre 8	14,4	5	N.D.
Madre 9	14,1	93	3,57
Valores normales	12 -17	10 -20	12,0 -14,0

Este hecho pone de manifiesto, en el caso de las concentraciones de reticulocitos de los padres del paciente nº 8, que aunque presentan valores ligeramente inferiores a los normales, los del paciente (Tabla 5) se encuentra aumentados mas de 200 veces con claros síntomas de anemia hemolítica que requiere incluso la aplicación de transfusiones periódicas de sangre.

Por lo que respecta a los valores de la actividad piruvato quinasa de la mayoría de los familiares de los pacientes se puede observar que son normales o ligeramente inferiores a los normales. Si, como veremos posteriormente, cada proge-

nitor es portador de un alelo mutado, es evidente que el producto del alelo normal es suficiente para proporcionar unos niveles fenotípicamente normales.

IV.1.2. 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 doble heterocigotas y, por consiguiente, que portan enzimas híbridas con propiedades diferentes. Además, la baja actividad residual de la enzima en los eritrocitos de estos pacientes obliga a que se practiquen transfusiones y los eritrocitos y leucocitos de los donantes, que contienen el producto del normal piruvato quinasa, enmascaran y confunden la caracterización bioquímica de la enzima deficiente. Por otra parte la aplicación de los métodos clásicos de purificación de enzimas tampoco proporcionan resultados satisfactorios, ya que las variantes enzimáticas suelen perder su actividad al ser más lábiles y, además, los procedimientos requieren grandes volúmenes de sangre que deben ser obtenidos antes de realizar la primera transfusión o meses después de la última, con las consiguientes dificultades clínicas.

Estas particularidades sugieren estudiar la enzimopatía piruvato quinasa a nivel molecular puesto que es lógico pensar que los fenotipos deficientes observados sean consecuencia de las mutaciones detectadas en la molécula de DNA. Para ello, la utilización de la reacción en cadena de la polimerasa puede facilitar la tarea y proporcionar informa-

ción que lleve a relacionar los genes mutados con las manifestaciones clínicas observadas. Esta información puede también ayudar a establecer criterios de naturaleza genética y, en algunos casos, elaborar pronósticos que marque pautas de terapia en el transcurso de la enfermedad.

En la Tabla 7 se recogen las diferentes mutaciones encontradas en el gen PK-LR de los pacientes estudiados con deficiencia piruvato quinasa. Los exones del gen fueron amplificados por PCR y su secuencia nucleotídica determinada según se indica en la Sección de Materiales y Métodos. Todas las mutaciones encontradas son causadas por la sustitución de un nucleótido. Doce de ellas son sustitutivas y originan el cambio de un aminoácido por otro: cuatro de ellas corresponden a C1456T y el resto a A1150G, G1529A, C993A, G1174A, G1154A, C1492T, A694G y G821C. Las 5 mutaciones restantes son sin sentido, esto es, ocasionan la síntesis incompleta de la proteína, cuatro de ellas corresponden a G721T y la restante a C1675T. Tres de las mutaciones, G694A A1150G, y G1154A, no han sido descritas previamente. Todos los pacientes son heterocigotos compuestos o dobles y solo uno (nº 10) muestra las mutaciones en el mismo exón. La mutación G1529A (Arg → Glu), que es la descrita como más frecuente en el Norte y Centro de Europa (Baroncelli y Beutler, 1993; Lenzner y col., 1997), 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 aunque 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. También es posible que la

muestra proporcionada contuviera sangre de transfusión lo que dificulta detectar la mutación.

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 desde una anemia severa a un estado hemolítico compensado. Este es un cuadro anémico similar al descrito por Lenzner y col. (1997) 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; esto es, pacientes con la misma disfunción son afectados de forma diferente. Sin embargo, en este estudio como excepción a esta regla, hemos encontrado dos pacientes (n° 3 y n° 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 las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Este hecho se ve corroborado en los trabajos de Vives-Corrons y col., (1980) que en su intento de encontrar una relación entre las anormalidades moleculares y las variantes defectivas en PK observan una concordancia en pacientes relacionados familiarmente.

IV.1.3. Naturaleza química de las sustituciones

La mutación A694G corresponde a un cambio en la posición 232 de la se-

cuencia aminoacídica, de glicina por serina, esto es, de un aminoácido con un grupo polar sin carga y sin actividad óptica por otro de la misma naturaleza polar pero con estereoespecificidad; este hecho podría influir en la estructura terciaria del monómero de la enzima (Tabla 8).

La mutación C721T, que fue encontrada por primera vez por Baronciani y Beutler (1993), origina una detención prematura de la cadena proteica en la posición 241 y, por consiguiente, una proteína truncada con la actividad enzimática prácticamente nula.

La mutación G821C descrita inicialmente por Zanella y col. (1997) implica una sustitución, en la posición 275 de Gly en Arg. Un cambio, de aminoácido no polar por otro polar positivo, que afecta, lógicamente, al balance de las cargas eléctricas de la proteína.

La mutación C993A, descubierta por Baronciani y col. (1995), se produce por sustitución de la tercera base del triplete, lo que provoca un cambio por un aminoácido de naturaleza química similar al sustituido, Asp → Glu, siendo por ello la posible alteración que se origine en la estructura, debida únicamente a un efecto estérico.

La mutación A1150G origina un cambio, en la posición 384, de treonina por alanina, dos aminoácidos de bajo peso molecular, teniendo el primero un grupo polar sin carga y el segundo un grupo alifático. A pH fisiológico el cambio no debería ocasionar trastornos significativos en la estructura de la enzima, aunque resulte obvio que debe producir una disfunción apreciable al manifestarse la anemia.

Tabla 8. Localización de las mutaciones en la secuencia aminoacídica de la piruvato quinasa

Mutación	Sustitución aminoacídica	Posición en la cadena
A694G	Gly \Rightarrow Ser	232
G721T	Gly \Rightarrow Stop	241
G821C	Gly \Rightarrow Arg	275
C993A	Asp \Rightarrow Glu	331
A1150G	Thr \Rightarrow Ala	384
G1154A	Arg \Rightarrow Lys	385
G1175A	Ala \Rightarrow Thr	392
C1456T	Arg \Rightarrow Trp	486
C1492T	Arg \Rightarrow Cys	498
G1529A	Arg \Rightarrow Glu	510
C1675T	Arg \Rightarrow Stop	559

La mutación G1154A produce un cambio en la posición 385, de arginina por lisina, dos aminoácidos de la misma naturaleza química pero la lisina con un tamaño ligeramente mayor que la arginina y con la carga positiva desplazada 1,5 Å aproximadamente, por lo que la posible alteración en la estructura podía atribuirse a un efecto estérico.

La mutación G1174A fue encontrada en 1994 por Lenzner y col. en pacientes con anemia hemolítica y deficiencia PK de Eslovenia. El triplete mutado codifica un cambio de alanina por treonina en la posición 392, dos aminoácidos con una pequeña diferencia de tamaño, pero uno no polar alifático y otro polar sin carga.

La mutación C1456T fue descrita por primera vez por Baronciani y Beutler, (1993) y posteriormente por Pastore y col., 1995a, 1995b). Mas tarde se des-

cribió que las variedades denominadas “Soresina”, “Milano” y “Parma” portaban la misma mutación (Bianchi y col., 1994, 1995). Esta mutación produce un cambio Arg \rightarrow Trp en la posición 486 de la secuencia proteica (Tabla 8), que corresponde a la sustitución de un aminoácido polar con carga positiva por otro no polar y voluminoso, del que resulta un ligero incremento de la Km por el fosfoenolpiruvato, esto es, disminuye la afinidad de la enzima por uno de los sustratos (Bianchi y col., 1995).

En 1996 Pastore y col. describieron la mutación C1492T que corresponde a un cambio en la posición 498 de Arg \rightarrow Cys, dos aminoácidos de naturaleza química diferente por lo que puede esperarse una alteración en la estructura proteica y por consiguiente en la actividad de la enzima.

La mutación G1529A fue descrita por primera vez por Baronciani y Beutler (1993); en ella se produce el cambio de Arg → Gln en la posición 510. Según Lenzner y col. (1997) este intercambio, como consecuencia de la aparición de un nuevo grupo polar puede desestabilizar la proteína, ya que como se ha comprobado *in vitro*, muestra una baja termoestabilidad y un aumento en la susceptibilidad a la degradación proteolítica.

La primera mutación en el nucleótido 1675 fue descrita por Baronciani y col. (1995) pero corresponde a un cambio de C en G encontrado en un paciente. Una mutación de la misma naturaleza que la encontrada por nosotros, (CGA → TGA), fue descubierta, también en pacientes españoles, por Zarza y col. (1998) y conduce, como en C721T, a la interrupción de la síntesis de la cadena polipeptídica en la posición 559, aunque en este caso el efecto sobre la actividad podría ser menor ya que la mutación se encuentra próxima al final de la secuencia codificante.

En las Figs. 9, 10 y 11 se muestran las gráficas correspondientes a las secuencias nucleotídicas (en sentido directo e inverso) de los mutantes G694A, A1150G y G1154A, descritos en este trabajo por primera vez; en ellas se indican los lugares en que aparecen los picos dobles en el cromatograma de la secuencia correspondiente a los cambios de los nucleótidos de los codones GGT → AGT, ACG → GCG y AGG → AAG. Estos cambios corresponden, como se ha indicado anteriormente, a las sustituciones aminoacídicas de Ser → Gly, Thr → Ala y Arg → Lys, respectivamente, y de las que no cabría esperar, en principio, grandes cambios en las

propiedades químico-físicas de las proteínas codificadas por los genes de las piruvato quinasa con estas alteraciones, aunque obviamente deben producir una disfunción proteica que conduce a la aparición de sintomatología clínica.

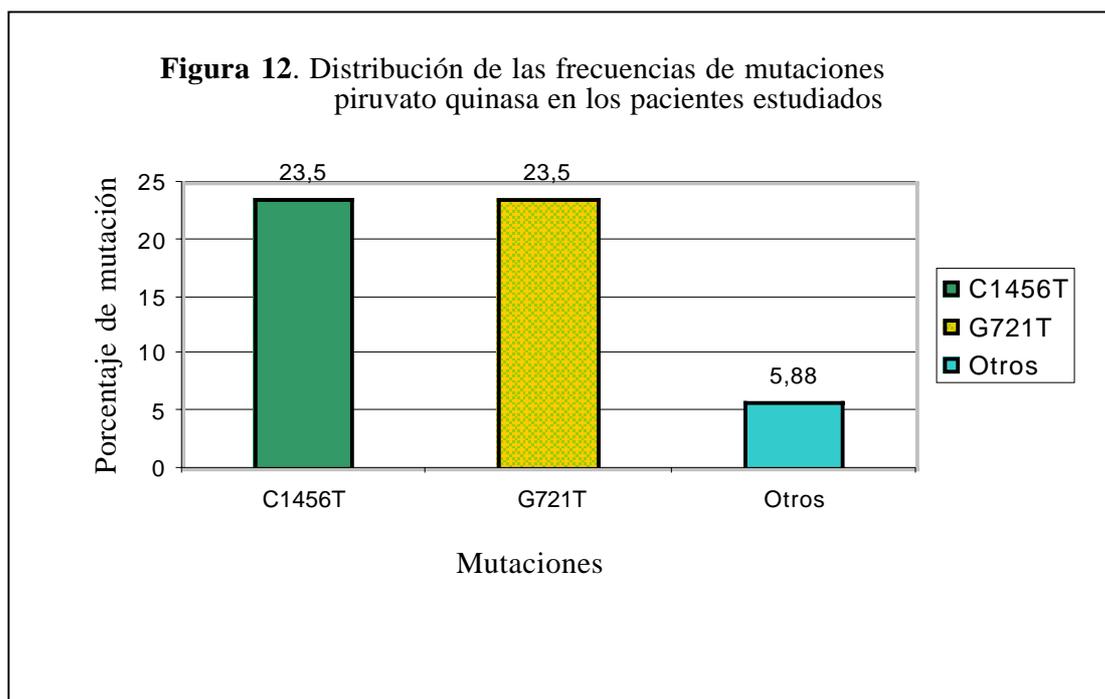
V.1.4. Distribución de la frecuencia de las mutaciones en piruvato quinasa.

La distribución de la frecuencia de las 17 mutaciones correspondientes a los 10 pacientes deficientes en piruvato quinasa que cursan con anemia hemolítica no esferocítica aparecen en el histograma de la Fig.12. Se puede observar que las mutaciones más frecuentes son la C1456T y la G721T, mutaciones sustitutivas que aparecen, independientemente, en más del 20% de los cromosomas mutados. La mutación C1456T aparece en todos los casos con una segunda mutación en un estado heterocigoto compuesto.

Como se desprende de la Tabla 9, en que aparece la distribución de la frecuencia de mutaciones PK en diversos países, la mutación C1456T es la que también con mayor frecuencia se ha encontrado en otros análisis similares realizados en España (Zarza y col., 1998), Italia (Zanella y col., 1997) y Chequia/Eslovaquia (Lenzner y col., 1997) y es la segunda mutación más frecuente encontrada en pacientes de Inglaterra, Alemania y Estados Unidos (Lenzner y col., 1997; Baronciani y Beutler, 1995 y Baronciani y col., 1995; Zanella y Bianchi, 2000).

La mutación G721T aparece también con una frecuencia mayor del 20%: 4 de los 17 alelos mutados; es una mutación sin sentido que conduce a un codón de

Figura 12. Distribución de las frecuencias de mutaciones piruvato quinasa en los pacientes estudiados



terminación de cadena. La G721T es la segunda mutación mas frecuente encontrada en pacientes de España y Francia (Zarza y col., 1998 y ouger y col., 1996) y la tercera mas frecuente en Italia y Estados Unidos (Zanella y col., 1996; Baronciani y Beutler, 1995; Baronciani y col., 1995). Sin embargo, esta 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 (Kanno y col., 1994a, 1994b) 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, como anteriormente se ha indicado, G694A, A1150G y G1154A, se describen por primera vez. En resumen, se puede deducir que las mutaciones en el gen PK que conducen a una deficiencia piruvato quinasa est-n

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 mientras que en el Sur la más frecuente es la C1456T (Baronciani y col., 1995; Rouger y col., 1996; Lenner y col., 1997; Zanella y col., 1997 y Zarza y col., 1998).

Las particularidades regionales y étnicas de la distribución de mutaciones de PK, que se pueden relacionar en la Tabla 9, sugieren que la mayoría de estas no pueden ser muy antiguas, al menos, mucho mas recientes que la separación de los grupos étnicos entre Europa y el Este asiático e incluso más recientes que las migraciones europeas que se extendieron a principio de los años mil hacia el Oriente, ya que existe una clara segregación de mutaciones restringidas a áreas geográficas limitadas.

Tabla 9. Distribución geográfica de las mutaciones más frecuentes en el gen PK-LR

PAISES	Mutaciones			Bibliografía
	C1456T	G721T	G1529A	
España	32%	14%	0%	Zarza y col., 1998
Italia	27%	4%	12%	Zanella y col. 1997
Francia	0%	4%	63%	Rooger y col.,1996
Alemania	4,2	0%	66%	Lenzner y col.,1997
Inglaterra	9,0%	0%	50%	Lenzner y col.,1997
Cheq./Eslov.	13,6%	0%	9,0%	Lenzner y col.,1997
Estados Unidos	9%	5%	50%	Baroncini y col.,1995
Japón	0%	0%	0%	Kanno y col., 1995
China	0%	0%	0%	Kanno y col.,1995

IV.1.5. Herencia genética de las deficiencias piruvato quinasa: Genealogías

Las genealogías de los pacientes nº 1, 3, 4, 6, 7 y 9 portadores de mutaciones en el gen piruvato quinasa se muestran en las Fig. 13 y 14. 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 nº 3 y nº 4 son hermanos y ambos, heterocigotos compuestos, heredan la mutación 721 del padre y 1456 de la madre.

En la Fig. 14 se muestra como el paciente nº 6 es portador de dos mutaciones, la 1456 que hereda de la madre y la 1675, que con toda probabilidad procede del padre, del que no se tienen datos por fallecimiento. Posteriormente, hemos podido detectar que el paciente trans

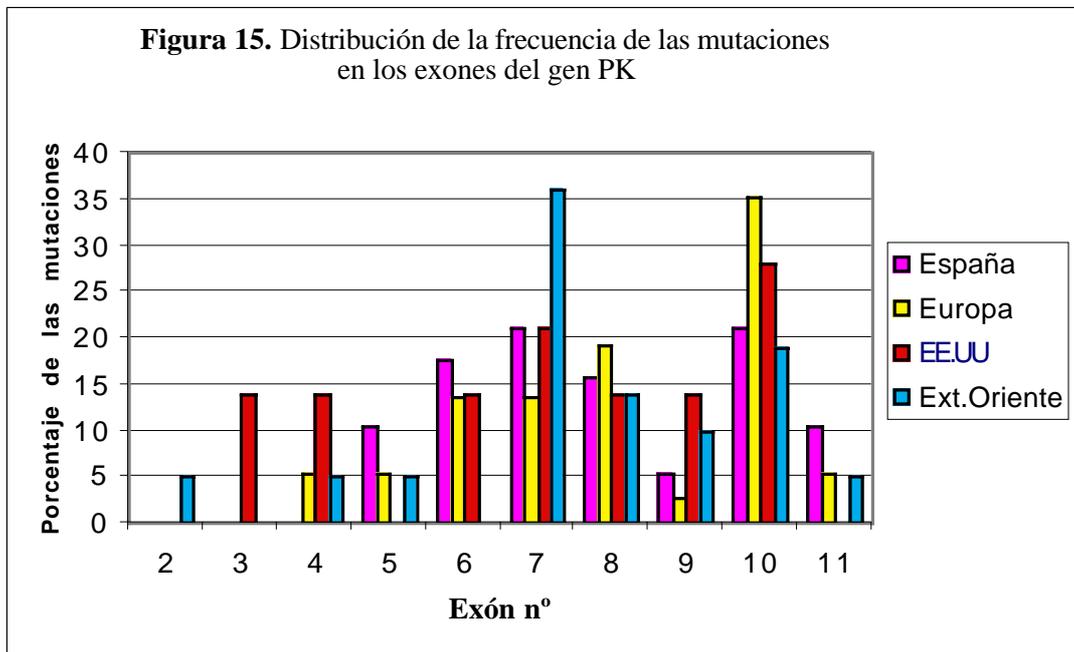
firió uno de sus alelos mutados a su hijo y el otro a su hija, que les convierte en portadores. El paciente nº 7 hereda la mutación 1492 del padre y la 1154 de la madre es, por lo tanto, también un heterocigoto compuesto. El paciente nº 9 también es un heterocigoto compuesto, con un alelo mutado que procede de la madre y otro que presumiblemente procede del padre y del que no ha sido posible obtener muestra.

IV.1.6. Localización de las mutaciones en los exones y en las regiones del gen piruvato quinasa

Como se ha indicado anteriormente, en la Tabla 7 se detalla 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 encontrado una en el exón nº 5, otra en el nº 7 y una tercera en el nº 11.

En el histograma de la Fig. 15 se compara la frecuencia de la localización de las mutaciones en los exones asociadas a una deficiencia en piruvato quinasa descritas en España (incluidas las de este trabajo) con las encontradas en Europa, en América y en el Lejano Oriente. Hasta el momento actual el número total de diferentes mutaciones asociadas a la deficiencia piruvato quinasa se eleva a 142. Del examen de la figura se puede comprobar que las mutaciones se en-

número de ellas en los exones 6, 7, 8 y 10. 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 y Extremo Oriente. En comparación con los exones adyacentes contrasta notablemente el bajo número de mutaciones descritas en el exón nº 9 y en particular con una escasa frecuencia en los países europeos. Esta observación no puede tener su base en la mayor proba-



cuentran desigualmente distribuidas a lo largo de la región codificante. Ninguna mutación ha sido detectada en el exón nº 1 que es específico de la isoenzima PK-R de eritrocito y que corresponde a la región reguladora del gen y solamente se ha encontrado una en el exón nº 2 (Ueneka y col., 1995).

De forma general, se puede observar en la Fig. 15 que, las mutaciones aumentan progresivamente desde los primeros exones, concentrándose el mayor

bilidad 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).

En la Figura 16 se muestran el alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las regiones en que parecen las mutaciones de piruvato quinasa de eritrocitos humanos comparadas con las de eritrocitos, ratón, rata y perro, las de músculo de gato, conejo, gallo y sapo y las de mosca y gusano; también apare-

cen las de levadura (*Saccharomyces 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 isoenzimas (I y II) con actividad piruvato quinasa (Garrido-Pertierra y Cooper, 1977, 1983). La isoenzima I es sensible a la activación por fructosa 1,6-bisfosfato y tiene unas propiedades cinéticas y reguladoras semejantes a las de los eritrocitos humanos.

En la Figura 16 se puede observar que el cambio Gly232 → Ser, que corresponde a la mutación G694A, se encuentra en una posición conservada en vertebrados salvo en el perro (Whitney y col., 1994), pero flanqueada por secuencias de aminoácidos muy variables. Esta observación y el hecho de que la sustitución producida sea a serina, que es el aminoácido que aparece en la secuencias de PK de gusano, hace pensar que la mutación debe alterar de una forma sutil la funcionalidad de la enzima.

La mutación G821C origina la sustitución de un aminoácido por otro con un tamaño y propiedades químicas muy diferentes (Gly275 → Arg) y, además, en una posición muy conservada en todas las especies incluidas los procariontes. Es previsible por tanto que el cambio afecte, de forma esencial, a la estructura tridimensional de la enzima, y por ende a su funcionalidad.

La mutación G821C produce la sustitución de Asp33 → 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+} (Larsen y col., 1994), y por el que, como se sabe, la enzima tiene un requerimiento absoluto. Es lógico pensar que tal sustitución produzca una grave disfunción de la enzima.

Las mutaciones A1150G, G1154A y G1175A 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. (Muirhead y col., 1986). Por su parte el Thr371 junto con la Lys313 posicionan y orientan el PEP en el centro activo (Larsen y col., 1994). Por ello, es indudable 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 en una región relativamente pequeña de la secuencia aminoacídica de la enzima. Van Solinge y col. (1997) sugieren que la arginina en la posición 486 forma enlaces de hidrógeno con otros residuos aminoacídicos próximos en la estructura terciaria y que su sustitución ocasionaría graves alteraciones en la misma. Sin embargo, como se puede observar en la Figura 16, la posición no se encuentra bien conservada y en la de rata, cuya homología con la de humana es más del 97%, se encuentra sustituida por la glutamina y 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 de 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. (1997). 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 de 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.

IV.2. Las relaciones estructura/función de las enzimas defectivas en piruvato quinasa

IV.2.1. Los cambios aminoacídicos y sus efectos en la actividad piruvato quinasa

Una primera aproximación a la relación entre estructura y función debería obtenerse del cambio en las propiedades químicas de los aminoácidos que se sustituyen en la secuencia aminoacídica de la proteína. Podría esperarse que, los cambios de aminoácidos con propiedades químico-físicas más 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 más severa de anemia hemolítica. Naturalmente, a dichos cambios hay que agregar los que conducen a una terminación prematura de la cadena polipeptídica.

De las diecisiete mutaciones encontradas cinco corresponden a señales de terminación de la cadena, tres a cambios conservativos (aminoácidos con propiedades químico-físicas similares) y once a cambios no conservativos (Tabla 8). Como se ha indicado anteriormente, de los primeros y de los últimos son de los se puede esperar una mayor alteración en la estructura proteica. Los primeros porque una prematura terminación de cadena originan proteínas incompletas con una evidente disfunción enzimática si el fragmento sintetizado no tiene un tamaño adecuado, y de las sustituciones no conservativas porque cuando intervienen aminoácidos, en los que la diferencia en sus propiedades físico-químicas es grande, sus efectos se pueden traducir en mayores disminuciones de la actividad y, por consiguiente, en un tipo de anemia hemolítica más grave. Siguiendo con esta pauta es lógico pensar que el cambio de un aminoácido polar cargado por otro también cargado pero con carga neta contraria 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 más grave de anemia. Sin embargo, este razonamiento no siempre parece cumplirse y, así, el cambio no conservativo Arg → Glu en un alelo del paciente nº1 no origina un descenso tan esperado de la actividad enzimática aunque se manifieste una anemia crónica severa, acompañada de ictericia y esplenomegalia. Por otra par-

te, el cambio conservativo Asp → Glu que conlleva la piruvato quinasa del paciente n° 2 y, 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.

Por tanto, como han indicado otros investigadores (Lenzner y col. 1994; Demina y col., 1998) no existe o, al menos, no se ha encontrado una relación directa entre las propiedades químico-físicas de los aminoácidos intercambiados, las actividades enzimáticas de la piruvato quinasa en sangre y las manifestaciones clínicas observadas. Y esto es particularmente difícil de encontrar en pacientes heterocigotos compuestos, ya que se debe tener en cuenta las propiedades de los productos de ambos genes. 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., (1997) 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 debe dejarse de lado otros factores que se encuentran en el entorno intra y extracelular y que aunque su influencia sea bastante menor son capaces de marcar diferencias en las manifesta-

ciones clínicas incluso entre parientes próximos, como pueden ser padres e hijos o hermanos. También debe tenerse en cuenta la asociación de subunidades con diferente mutación lo que hace más difícilmente previsible el efecto de la mutación en los dos alelos.

Podría resumirse que la situación de deficiencia piruvato quinasa es parecida a la que tiene lugar en pacientes con otras enzimopatías hereditarias que se manifiestan en los eritrocitos (Luzzatto y Mehta, 1995; Bautista y Luzzatto, 1997). Y es que además del genotipo, los factores bioquímicos y fisiológicos del entorno celular juegan un papel clave en el grado de severidad de la enfermedad. Este hecho se pone de manifiesto en pacientes, con idéntico genotipo deficiente piruvato quinasa que suelen poseer unas manifestaciones clínicas parecidas de la enfermedad. Los pacientes n° 3 y n° 4 son hermanos y, como se demuestra en este trabajo, sus características genéticas respecto a la deficiencia piruvato quinasa son idénticas, la actividad de las enzimas son iguales y el grado de severidad de las anemias hemolíticas similares.

IV.2.2. 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 conocimiento de un modelo tridimensional 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 moleculares que ocasionan

las alteraciones clínicas en las deficiencias enzimáticas. Un hecho a tener en cuenta es que todos los pacientes estudiados son heterocigotos compuestos para dos diferentes mutaciones en PK-LR y ello, como mencionamos anteriormente, complica considerablemente la interpretación de los efectos debidos a mutaciones específicas.

La piruvato quinasa de eritrocitos está constituida como se ha indicado previamente, por un homotetrámero de 574 aminoácidos. La subunidad tienen forma elíptica con el eje longitudinal de 75 Å y el transversal de 45 Å (Fig. 17) y contiene un centro activo en donde se unen los dos sustratos, PEP y ADP y dos sitios para la unión de los dos cationes esenciales para la actividad, Mg^{2+} o Mn^{2+} y K^+ . Además, como la enzima se encuentra alostéricamente regulada tiene al menos un centro en el que se unen los efectores positivos, como la fructosa-1,6-bisfosfato, y otro al que se une los efectores negativos como el ATP.

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 (Muirhead y col., 1986) y de conejo (Larsen y col., 1994) y que han sido resueltas con resoluciones de 2,6 y 2,9 Å, respectivamente. Se ha podido comprobar que la PK-M1 de músculo de conejo y de gato muestran una homología muy significativa con la PK-R de eritrocitos humanos, con una identidad de la secuencia de alrededor del 70% y con 44 residuos extra en la región N-terminal de la isozima R.

El estudio de la estructuras tridimensionales de la piruvato quinasa de músculo de conejo y de gato ha permitido

conocer los sitios de unión de los sustratos, 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. Sin embargo, debido a las diferencias en las estructuras primarias entre la PK de conejo y de gato y de estas con la de eritrocitos humanos, las predicciones deben realizarse con la debida cautela y teniendo en cuenta esta circunstancia.

Siguiendo con 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.

Desafortunadamente no existe un modelo tridimensional de la piruvato quinasa humana en base a su estructura cristalina y, por ello, se modelizan sobre las estructuras de las enzimas de músculo de conejo y de gato (Fig. 18). En cada subunidad de la PK se diferencian cuatro dominios formados por cadenas unidas por segmentos polipeptídicos flexibles con una función o funciones determinadas. Estos dominios se denominan: N (o N-terminal), A, B y C (o C-terminal) (Muirhead y col., 1981).

El dominio N-terminal, comprendido entre los residuos 42 y 85, implica el

área de contacto entre las subunidades en la molécula tetramérica. El dominio A, de mayor tamaño y formado por dos segmentos de estructura primaria (86-159 y 263-431), tiene forma de cilindro, el clásico barril de conformación $\alpha - \beta$ con 8 hélices α y 8 láminas β dispuestas en sentido antiparalelo. El dominio B comprende desde el aminoácido 160 al 262, con un lazo característico que se extiende desde el extremo a la tercera lámina β del dominio A y consiste principalmente en láminas β antiparalelas que forman la parte de la molécula más alejada del centro del tetrámero con una estructura poco densa y de apariencia flexible, al cual no se ha podido adscribir una función clara. Finalmente, el dominio C-terminal, comprende desde el residuo 432 al 574 y forma una estructura retorcida y abierta de tipo $\alpha\beta$ que juega un importante papel en el proceso de tetramerización Wouter y col. 1997)

Los dominios A y C se interconectan entre sí formando una región o zona compacta que se considera el núcleo de la enzima y donde se encuentra, aunque más próximo de A que de C, el centro activo. Según Muirhead y col. (1986) y Larsen y col. (1994) el PEP se enlaza al final de la 8ª lámina β del dominio A y a una distancia de 2,2 Å se une el catión bivalente. Walker y col. (1992) proponen la existencia de dos cavidades de gran importancia en el área de la interacción de los dominios A y C, la cavidad 86 (Arg 86) para la unión de ADP y la cavidad 510 (Arg 510) para la unión de un segundo activador alostérico. Estas cavidades están divididas por la cuarta hélice del dominio C (C α 4), la cual se enlaza, por puentes salinos y enlaces de hidrógeno, y a través de los residuos de Ala 399, Arg 510 y Arg 488, a los de

Leu 401, Asp 400 y Asn 113, del dominio A. Este hecho origina una conformación especial en la interfase de los dominios A y C.

A los sitios de unión anteriormente indicados deben añadirse por su importancia en el proceso catalítico los residuos aminoácídicos que forman el centro activo y se une el fosfoenolpiruvato (Arg 163, Ser 286, Phe 287, Lys 313, Gly 338, Thr 371) y las que intervienen en la catálisis ácido-base y en la unión al K^+ (Asn 156, Lys 313) y al Mn^{2+} (Glu 315, Asp 339). (Walker y col., 1992; Larsen y col., 1994; Van Solinge y col., 1997)

De las nueve mutaciones sustitutivas diferentes descritas en este trabajo (Tabla 10), una se localiza en el dominio B (694) cinco en el dominio A (821, 993, 1150, 1154 y 1175), y tres en el dominio C (1456, 1492 y 1529) (Fig. 17).

La mutación A694G origina el cambio Gly232 \rightarrow Ser el cual 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 el cambio aminoacídico altere de forma importante la actividad enzimática. Sin embargo, el nivel de la actividad enzimática de la piruvato quinasa en sangre del paciente n° 9, que es el portador de la mutación, está disminuido cerca de la décima parte del valor normal. Este hecho conduce a pensar que la posición 232, que como se puede observar en Fig. 18 se encuentra bien conservada en una región de gran variabilidad en animales vertebrados, debe jugar un papel importante en la estructura de la proteína, bien a nivel de catálisis o de estabilidad. 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 (Jurica y col. 1998) y, se ha demostrado, que el dominio B es el más alejado del área de contacto entre las subunidades (Muirhead y col. 1981, 1986). Por todo ello, aunque todavía no se le ha asignado ninguna función determinada al dominio B su considerable pérdida de actividad por esta sustitución puede estar relacionada con un impedimento estérico del residuo de la Ser232 con el de Phe 235 que podría alterar notablemente la estructura terciaria de la PK (Fig. 19, A y B)

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 α (concretamente la $A\alpha 3$) simplemente por efecto estérico. Pero a este hecho debe añadirse la proximidad del residuo Asp 277 que debe originar una atracción electrostática muy fuerte con el de Arg (Fig 19, 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 \rightarrow Glu en la posición 331 de la estructura primaria de la PK. 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) (Creighton, 1993). 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, sin estructura secundaria y en la que el simple efecto estérico que se produce en la sustitución no debe alterar la conformación de la enzima de forma significativa (Fig. 19, E y F). Sin embargo, 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 n° 2 es el portador de la mutación C993A que produce esta sustitución y a pesar de llevar el otro alelo normal el nivel de la actividad de la PK en sangre es considerablemente menor que en el de individuos normales.

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. 20, A y B). Por ello se debe esperar que la actividad de la enzima se encuentre disminuida respecto a la normal.

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. 20, 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. El paciente n° 9 que es portador de dicha mutación muestra, en sangre, un 50% de la actividad PK de individuos normales que se manifiesta en un estado hemolítico compensado.

La mutación G1174A origina el cambio de aminoácidos Ala \rightarrow 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. 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 (se mantiene compacta en una región relativamente distante del área de interco-

nexión de los dominios A y C en la que se encuentra el centro activo (Fig. 20, E y F) Los datos hematológicos del paciente n° 5, que es portador de esta mutación, no varían significativamente respecto a los normales y el estado del paciente es del tipo hemolítico compensado.

La mutación C1456T origina el cambio de Arg \rightarrow Trp en la posición 486 localizada en la hélice 3α 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. 21 A y B). De la diferencia de tamaño entre los dos residuos aminoácidos puede esperarse una ruptura de la conformación de la hélice α y aunque la región es espaciosa se encuentra en la zona de interconexión entre los dominios A y C. Como se ha indicado previamente la zona de conexión entre estos dos dominios es 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 (Junica y col., 1998). La inserción de este aminoácido de gran tamaño debe provocar, por tanto, efectos perjudiciales en la estructura de 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, está muy disminuida.

La mutación C1492T causa el cambio Arg \rightarrow 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. 21, C y D) lo que debe proporcionar a esta pequeña región de sólo tres aminoácidos sin es-

estructura secundaria, y comprendida entre la lamina C β 2 y la hélice C α 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, 5,73Å, no parece lo suficiente para que los dos grupos SH reaccionen entre sí. La piruvato quinasa contiene 6 residuos cisteínicos y ningún puente disulfuro; este hecho contrasta con la estructura de otras proteínas, como la lisozima y la ribonucleasa, que forman 4 enlaces disulfuro y, en el caso de la ribonucleasa no existe ningún SH libre (Cantor y Schinmel, 1980). En nuestro caso, como la inserción de una Cys no parece implicar la formación de un enlace covalente -S-S- y si la desaparición de neta de tres enlaces de hidrógeno esto debe permitir mayor movilidad a C β 2 y C α , 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 actividad de la PK encontrada en la sangre del paciente n° 7 que es el portador de esta mutación es solo la mitad de la encontrada en individuos normales y la deficiencia cursa con un estado hemolítico compensado.

La mutación G1529A produce el cambio de Arg \rightarrow 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. (1997) 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. 21, 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 la 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.

En el presente trabajo de investigación se ha estudiado la deficiencia piruvato quinasa eritrocitaria de diez pacientes con el objeto de identificar y caracterizar molecularmente las mutaciones en el gen PK-LR y conocer la posible relación de aquellas con la actividad catalítica de la enzima, las características estructurales y las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

Del trabajo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1ª. Los análisis de la relación entre actividad y clínica en los pacientes con deficiencia piruvato quinasa que se caracterizan por una baja actividad específica de la enzima en sangre y un cuadro de anemia hemolítica no esferocítica ha permitido establecer una correlación directa entre la actividad de la enzima y el grado de alteración clínica observada.

2ª. El proceso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el análisis de la secuencia nucleotídica resultan un sistema de gran utilidad en el diagnóstico molecular de la deficiencia piruvato quinasa y en la determinación de la mutación genética en la zona codificante del gen. De los 10 pacientes, 7 resultaron con una mutación diferente en la secuencia codificante de cada alelo y en los 3 restantes en uno de sus alelos no se encontró mutación en la zona codificante. Las genealogías de los pacientes estudiados confirman el carácter hereditario de la mutación.

3ª. Como consecuencia de la mutación de nucleótidos en el gen PK-LR de pacientes con deficiencia en piruvato qui-

nasa, se han encontrado, en los 17 alelos identificados, 11 mutaciones diferentes. Nueve de estas causan la sustitución de un aminoácido en la cadena proteica y las dos restantes originan la síntesis incompleta de la misma. Tres de estas mutaciones, G694A, A1150G y G1154A que produce los cambios Gly232 → Ser, Thr384 → Ala y Arg385 → Lys, respectivamente, se describen por primera vez.

4ª La mayor frecuencia de las mutaciones piruvato quinasa se localiza en el exón nº 10, lo mismo que las mutaciones descritas en otros países de Europa, América y el Extremo Oriente. Las mutaciones descritas se encuentran en posiciones y en regiones contiguas muy conservadas en las secuencias nucleotídicas homólogas de diferentes especies.

5ª. La disminución en la actividad enzimática que producen ocho de las mutaciones sustitutivas localizadas en los dominios A y C del monómero de la PK es fácilmente comprensible ya que entre ambos dominios se encuentran los sitios de unión de los sustratos, de los cationes, de los efectores y la zona de contacto entre la subunidades. Sin embargo, la mayor disminución de la actividad enzimática corresponde a la presencia de la mutación A694G (Gly232 → Ser), la cual se localiza en el dominio B del que no se conoce una función específica en el proceso catalítico.

6ª Los estudios de modelización molecular reflejan que las mutaciones que originan los cambios Gly275 → A, Thr384 → Ala, Arg486 → Trp y Arg510 → Gln, bien porque desajustan

el balance de las cargas eléctricas de la proteína o bien por impedimento estérico ocasionan fuertes modificaciones en la estructura local de la molécula. Además, al encontrarse esta parte próxima al centro activo se puede explicar los valores disminuidos de actividad de la enzima.

- Aurbourg P., Blanche S. and Janbaque I. (1990) Reversal of early neurologic and neuroradiological manifestations of X-linked adrenoleukodystrophy by bone-marrow transplantation. *N. Eng. J. Med.* 1860-1866.
- Baronciani, L. and Beutler E. (1993) Analysis of pyruvate kinase-deficiency mutations that produce nonspherocytic anemia. *Pro. Nat. Acad. Sci. USA* **90**, 4324-4327.
- Baronciani, L. and Beutler E. (1995) Molecular study of pyruvate kinase-deficient patients affected by nonspherocytic hemolytic anemia. *J. Clin. Invest.* **4**, 1702-1709.
- Baronciani L. , Magalhaes L.Q. , Mahoney D.H., Westwood B. Adekile A.D. Lappin T.R.J. and Beuler E. (1995) Study of the molecular defects in pyruvate kinase deficient patients affected by nonspherocytic hemolytic anemia. *Blood Cell Mol. Dis.* **21**, 49-55.
- Baronciani L., Bianchi P. and Zanella A. (1996a) Hematologically important mutations: red cell pyruvate kinase. *Blood Cells Mol Dis.*, **22**, 85-89.
- Baronciani L., Bianchi P. and Zanella A. (1996b) Hematologically important mutations: red cell pyruvate kinase. *Blood Cells Mol Dis.*, **22**, 259-264.
- Barton G.J. (1990) Protein multiple sequence alignment and flexible pattern matching. *Methods Enzymol* **183**, 403-415.
- Bautista J.M. and Luzzatto L. (1997) Glucose 6-phosphate dehydrogenase. In: *Protein Dysfunction in Human Genetic Disease*. Swallow D.M. and Edwards Y.H. (eds) BIOS Scientific Publisher Ltd. Oxford. UK.pp. 33-56.
- Bennet, V. (1985) The membrane skeleton of human erythrocytes and its implications for more complex cells. *Ann. Rev. Biochem.* **54**, 273-304.
- Beutler ,E. (1986) Red Cell Metabolism. In: *Methods in Hematology*, vol.16, Churchill Livingstone. Edimburg.
- Beutler ,E. (1990) The genetic of glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Sem. Hemat.* **27**, 137-164.
- Beutler E. and Baronciani L. (1996) Mutations in pyruvate kinase. *Human Mutation* , **7**, 1-6.
- Beutler E. and Gelbart T. (2000) Estimating the prevalence of pyruvate kinase deficiency from the gen frequency in the general white population. *Blood* **95**, 3585-3588
- Bianchi P., Terragna C., Zappa M., Alfinito F. and Zanella A. (1994) Molecular characterization of *L-PK* gene in pyruvate quinase (PK) deficient Italian patients. *Blood* **84** (Suppl 1), 97a.
- Bianchi P. and Zanella A. (2000) Hematological important mutations: red cell pyruvate kinase. *Blood Cells Mol Dis* **26**, 47-53
- Bianchi P., Zanella A. and Zappa M. (1995) A new point mutation G/A (Asp390-Asn) in an italian patient with erythrocyte pyruvate kinase deficiency. *Blood.* **86** (Suppl 1), 133a.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for

- screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**,1513-1515.
- Booth D.R. Sunde M. and Bellot V. (1997) Instability, unfolding and aggregation of human lysozyme variants underlying amyloid fibrillogenesis. *Nature* **385**, 787-793.
- Branden C. and Tooze J. (1991) Introduction to Protein Structure. Garland Pub.Inc. New York.
- Brewer G.J. (1980) Inherited erythrocyte metabolic and membrane disorders. *Med. Clin. North. Am.* **64**, 579-596.
- Brewer, G.J.(1984) *Red Cell Metabolism and Function*, 3th ed., Plenum Press, New York.
- Cantor C.R. and Schimmel D. (1980) Biophysical Chemistry. Part I. W.H. Freeman & Co (eds).New York.
- Chamberlin M.E., Ubagai T., Mudd S.H., Levy H.L. and Chou J.J. (1977) Dominant inheritance of isolated hypermethioninemia is associated with a mutation in the human methionine adenosyltransferase 1A gen. *Am. J. Hum. Genet.* **60**, 540-546.
- Cognet M., Lone Y.C. ,Vaulont S., Khan A. and Marie J. (1987) Structure of rat L-type pyruvate kinase gene. *J Mol Biol* **196**, 11-25.
- Consler T.G., Woodard S.H. and Lee J.C.(1989) Effects of Primary Sequence Differences on the Global Structure and Function of an Enzyme: A Study of Pyruvate Kinase Isozymes. *Biochemistry* **28**, 8756-8764.
- Creighton T.E. (1993) Proteins. Structure and Molecular Properties (2nd ed) W.H. Freeman & Co. New York.
- Crosby W.H. (1950) Hereditary nonspherocytic hemolytic anemia. *Blood* **5**, 233-253.
- Cummings M. R. (1995) Herencia humana. Principios y conceptos. 3^a Ed. Interamericana-Mc Graw-Hill. Madrid.
- Dacie J.V. Mollinson P.L. Richardson N., Selwyn J.G. and Shapiro L. (1953) Atypical congenital haemolytic anaemia. *Q. J. Med.* **85**, 79-97.
- Dacie, J. (1985) The Haemolytic Anemias. In: *The Hereditary Haemolytic Anemias*. Grune and Stratton (eds), Vol.1, 419. New York.
- De Medicis E., Ross P., Friedman R., Hume H., Marceau D., Milot M., Lyonais J. and De Braekeleer M. (1992) Hereditary nonspherocytic hemolytic anemia due to pyruvate kinase deficiency : a prevalence study in Quebec (Canada) *Hum. Hered.* **42**, 179-183.
- DeGruchy G.C., Santamaria J. C., Parson J.C. and Crawford H. (1960) Nonspherocytic congenital hemolytic anaemia. *Blood* **16**, 1371-1397.
- Demina A., Varughese K.I., Barbot J. Forman L. and Buetler E. (1998) Six previously underscribed pyruvate kinase mutations causing enzyme deficiency. *Blood* **2**, 647-652.
- Elsevier J.P. and Fridovich-Kiel J.L. (1996) The Q188R mutation in human galactose 1-phosphate uridylyltransferase acts a parcial dominant negative. *J. Biol. Chem.* **271**, 32002-32007.

- Feng C.S., Tsang S.S. and Mak Y.T. (1993) Prevalence of pyruvate kinase deficiency among the Chinese: Determination by the quantitative assay. *Am. J. Hematol.* **43**, 271-273.
- García S.C., Moragón A.C. and López-Fernández (1979) Frequency of glutathione reductase, pyruvate kinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in a Spanish population. *Hum. Hered.* **29**, 310-313.
- García-Olalla C. and Garrido-Pertierra A. (1987) Purification and kinetic properties of pyruvate kinase isoenzymes of *S.typhimurium*. *Biochem. J.* **241**, 573-581.
- Garrido-Pertierra A. and Cooper R. A. (1977) Pyruvate formation during the catabolism of simple hexose sugars by *E.coli*: Studies with pyruvate kinase-negative mutants. *J. Bacteriol.* **129**, 1208-1214.
- Garrido-Pertierra A. and Cooper R.A. (1982) Evidence for two distinct pyruvate kinase genes in *E.coli* K-12. *FEBS* **162**, 420-422.
- Gilsanz F., Vega M.A., Gómez-Castillo E. and Ruiz-Balda J.A. Omeñaca F. Fetal anaemia due to pyruvate kinase deficiency. *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal* **69**, 523-527.
- Gilsanz F. (1996a) Anemia: manifestaciones clínicas y clasificación. En: *Medicine. 7ª Serie. IDEPSA. Madrid.* pp. 1169-1171.
- Gilsanz F. (1996b) Anemia: manifestaciones clínicas y clasificación. En: *Medicine. 7ª Serie. IDEPSA. Madrid.* pp. 1213-1216.
- Glenn D., Gelbart T. and Beutler E. (1994) Tight linkage of pyruvate kinase (PKLR) and glucocerebrosidase (GBA) genes. *Hum Genet* **93**, 635-638.
- Gomez-Gallego F., Garrido-Pertierra A. Mason P. J. and Bautista J.M. (1996) Unproductive folding of the human G6PD-deficient variant A. *FASEB J.* **10**, 153-158.
- Gomez-Gallego F., Garrido-Pertierra A. and Bautista J.M. (2000) Structural defects underlying protein dysfunction in human glucose-6-phosphate dehydrogenase A deficiency. *J. Biol. Chem.* **275**, 9256-9262
- Guyton A.C. y Hall J.E. (1996) *Tratado de Fisiología Médica.* 9ª ed. Interamericana-McGraw Hill. Madrid.
- Hardisty, R.M. and Weatherall, D.J. (1982) *Blood and its disorders*, 2nd ed. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
- Harrison, P.R. (1984) Molecular Analysis of Erythropoiesis. *Experimental Cell Research.* **155**, 321-344.
- Holzhtutter H.G., Jacobash G. and Bisdorff A. (1985) Mathematical modelling of metabolic pathways affected by an enzyme deficiency. A model of glycolysis in normal and pyruvate-kinase-deficient red blood cells. *Eur. J. Biochem.* **149**, 101-111.
- Hoogerbrugge P.M., Brouwer O.F., Bordigini P., Ringden O., Kapaun P., Ortega J.J., Suillet G. and Frappaz D. (1995) Allogeneic bone-marrow transplantation

for lysosomal storage diseases. *Lancet* **345**, 1398-1402.

International Committee for Standardization in Haematology. (1979) Recommended Methods for the Characterization of Red Cell Pyruvate Kinase Variants. *British Journal of Haematology* **43**, 275-286.

Ikeda Y., Tanaka T. and Noguchi T. (1997) Conversion of Non-allosteric Pyruvate Kinase Isozyme into an Allosteric Enzyme by a Single Amino Acid Substitution. *Journal of Biological Chemistry* **33**, 20495-20501.

Ish-Horowitz, D. and Burke, J.F. (1981) Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.* **12**, 1863.

Jacobach G. and Rapoport S.M. (1996) Hemolytic anemias due to erythrocyte enzyme deficiencies. *Mol. Aspect.* **17**, 143-170.

Jurica M.S., Mesecar A., Heath P.J. Shi W., Nowak T. and Stoddard B.L. (1998) The allosteric regulation of pyruvate kinase by fructose-1,6-bisphosphate. *Structure* **6**, 195-210.

Kahn A. Vives-Corrons J.L., Marie J. Galand C. and Bolvin (1977) A Spanish family with erythrocyte pyruvate kinase deficiency: contribution of various immunologic methods in the study of the mutant enzyme. *Clin. Chim. Acta* **75**, 71-78.

Kanno H., Fujii H., Hirono A. and Miwa S. (1991) cDNA cloning of human R-type pyruvate kinase and identification of a single amino acid substitution (Thr¹⁸⁴-Met) affecting enzymatic stability in pyruvate kinase variant (PK Tokyo) as-

sociated with hereditary hemolytic anemia. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **88**, 8218-8221.

Kanno H., Fujii H., Hirono A. Omine M and Miwa S (1992a) Identical point mutations of the R-type pyruvate kinase (PK) cDNA found in unrelated PK variants associated with hereditary hemolytic anemia. *Blood* **79**, 1347-1350.

Kanno H., Fujii H. and Miwa S. (1992b) Structural analysis of human kinase L-PK gene and identification of the promoter activity in erythroid cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **188**, 516-523.

Kanno H., Fujii H. and Miwa S. (1993a) Low substrate affinity of pyruvate kinase variant (PK Sapporo) caused by a single amino acid substitution (426 Arg-Gln) associated with hereditary hemolytic anemia. *Blood* **81**, 2439-2441.

Kanno H., Fujii H., Tsujino G. and Miwa S. (1993b) Molecular basis of impaired pyruvate kinase isozyme conversion in erythroid cells. A single amino acid substitution near the active site and decreased mRNA content of the R-type PK. *Biochem Biophys Res Commun* **192**, 46-52.

Kanno H. Wei D.C., Chan L.C., Mizoguchi H. Nakahata T. Narisawa K. Fujii H. and Miwa S. (1994a) Hereditary Hemolytic Anemia Caused by Diverse Point Mutations of Pyruvate Kinase Gene Found in Japan and Hong Kong. *Blood* **83**, 3506-3509.

Kanno H., Fujii H. and Miwa S. (1994b) Molecular heterogeneity of pyruvate kinase deficiency identified by single strand conformational polymorphism (SSCP) analysis. *Blood* **84** (Suppl 1), 13a.

Kanno H., Marimoto M., Fujii H., Tsujimura T., Asai H., Noguchi T. Kitamura Y and Miwa S. (1995) Primary structure of murine red blood cell-type pyruvate kinase (PK) and molecular characterization of PK deficiency identified in the CBA strain. *Blood* **86**, 3205-3209.

Kanno H., Fujii H., Wei D.C., Chan L.C., Hirono A., Tsukimoto I. and Miwa S. (1997) Frame shift mutation, exon skipping, and a two-codon deletion caused by splice site mutations account for pyruvate kinase deficiency. *Blood* **11**, 4213-4218.

Kaufman R.J. and Pipe S.W. (1997) Factor VIII and haemophilia A. In: *Protein Dysfunction in Human Genetic Disease*. Swallow and Edwards Y.H. (Eds). BIOS Scientific Pub. Ltd. Oxford. U.K.

Kugler W., Willaschek C., Holtz C., Ohlenbusch A., Laspe P., Krugener R., Muirhead H., Schroter W. and Lakomek M. (2000) Eight novel mutations and consequences on mRNA and protein level in pyruvate kinase-deficient patients with nonspherocytic hemolytic anemia. *Hum Mutant* **15**, 261-272

Lacronique V., López S. and Miquerol L. (1995) Identification and functional characterisation of an erythroid-specific enhancer in the L-type pyruvate gene. *J. Biol. Chem.* **270**, 14089-14997.

Lakomeck M., Huppke P. Neubauer B. Pekrun A. Winkler H. and Schröter W (1994). Mutations in the R-type pyruvate kinase gene and altered enzyme kinetic properties in patients with hemolytic anemia due to pyruvate kinase deficient. *Ann Hematol* **68**, 253-260.

Larsen T.M., Laughlin L.T., Holden H.M. Raymet I. and Reed G.H. (1994) Structure of rabbit muscle pyruvate kinase complexed with Mn^{2+} , K^+ , and pyruvate. *J. Biochem.* **33**, 6301-6305.

Leblond P.F., Coulombe L. and Lyonnais J. (1978) Erythrocyte populations in pyruvate kinase deficiency anaemia following splenectomy. II. Cell deformability. *Br. J. Haematol.* **39**, 63-70.

Lecomte, M.C., Delaunay, J. and Dhermy. (1997) Spectrine and other red cell membrane proteins in hereditary elliptocytosis and spherocytosis. In: *Protein Dysfunction in Human Genetic Disease*. Swallow, D. M. and Edwards Y.H. (eds). BIOS Scientific Publishers Limited. Oxford, UK.

Lenzner C., Nürnberg P., Thiele B. J., Reis A., Brabec V., Sakalova A. and Jacobasch G. (1994) Mutations in the pyruvate kinase L gene in patients with hereditary hemolytic anemia. *Blood* **83**, 2817-2822.

Lenzner C. Nürnberg P. ,Jacobasch G. Gerth C. and Thiele B-J. (1997) Molecular analysis of 29 pyruvate kinase-deficient patients from Central Europe with hereditary hemolytic anemia. *Blood* **89**, 1793-1799.

Lukens J.N. (1993) Hereditary hemolytic anemias associated with abnormalities of erythrocyte anaerobic glycolysis and nucleotide metabolism. In: *Wintrobe's Clinical Hematology*. Lee G.R. Bithell T.C., Foester J., Athens J.W. and Lukens J.N. (eds) 9th ed. Lea & Febiger, 900-921.

Luque J., Pinilla M., Escrivá F. y Giménez A. (1991) Bioquímica de las células

sanguíneas: serie eritrocitaria. En: *Bioquímica*. Vol. II. 2ª Ed. Herrera E. Interamericana McGraw-Hill.

Luzzatto L. and Mehta A. (1995) Glucose 6-fosphate dehydrogenase deficiency. In: *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. pp. 3367-3898.

Manco L., Ribeiro M.L., Maximo V., Almeida H., Costa A., Freitas O., Barbot J., Abade A. and Tamagnini G. (2000) A new PKLR gene mutation in the R-type promoter region affects gene transcription causing pyruvate kinase deficiency. *Br. J. Haematology* **110**, 993-997

Marie J., Simon M.P., Dreyfus J.C. and Kahn A. (1981) One gene, but two messenger RNAs encoded liver L and red cell L pyruvate quinase subunits. *Nature* **292**, 70-72.

Marie J., Vives-Corrons J. L., Kahn A. and Kernemp B. (1977) Hereditary erythrocyte pyruvate deficiency: molecular and functional studies of four mutant PK variants detected in Spain. *Clin. Chim. Acta* **81**, 153-162

Martinov M.V., Plotnikov A.G., Vitvitsky V.M. and Ataulakhanov F.I. (2000) Deficiencies of glycolytic enzymes as a possible cause of hemolytic anemia. *Biochim Biophys Acta* **1474**, 75-87.

Mason P.J. (1996) New insight into G6PD deficiency. *Br. J. Haematol.* **94**, 585-591.

May J., Meyer C.G., Gorssterlinden L., Ademowo O.G. Mockenhaupt F.P., Olumese P.E., Falusi A.G., Luzzatto L.

and Bienzle U. (2000) Red cell glucose-6-phosphate dehydrogenase status and pyruvate kinase activity in a Nigerian population. *Trop Med Int Health* **5**, 119-123.

McGilvery R.W. and Murray T.W. (1974) Calculated equilibria of phosphocreatine and adenosine phosphates during utilization of high energy phosphate by muscle. *J. Biol. Chem.* **249**, 5845-5850.

McMullin M.F. (1999) The molecular basis of disorders of red cell enzymes. *J.Clin. Pathol.* **52**, 241-244.

Miwa S. (1990) Pyruvate kinase deficiency. In: *Isozymes, structure, function and use in Biology and Medicine*. Ogita Z.I. and Marker C.L. (eds). Wiley-Liss. New York.

Miwa S. and Fujii H. (1985) Molecular aspects of erythroenzymopathologies associated with hereditary hemolytic anemia. *Am. J. Hematol.* **19**, 293-298.

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) Recommended methods for the characterization of red cell pyruvate kinase variants. International Committee for Standardization in Haematology. *Br.J. Haematol.* **43**, 275-279.

Miwa S., Kanno H. and Fujii H. (1993) Pyruvate Kinase Deficiency: Historical perspective and recent progress of molecular genetics. *Am J. Hematol.* **42**, 31-35.

Miwa S. and Fujii H. (1996) Molecular basis of erythroenzymopathies associated

with hereditary hemolytic anemia: tabulation of mutants enzymes. *American Journal of Hematology* **51**, 122-132.

Miller, S.A., Dykes, D.D. and Polesky, H.F. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* **16**, 1215-1216.

Monod J. Changeux J.-P and Jacob J. (1963) Allosteric proteins and cellular control systems *J.Mol.Biol.* **6**, 306-329.

Muirhead H. Grant J.P. Lawton C.A. Midwinter J.C. Nocton J.C. and Stuart D.I. (1981) The structure and function of pyruvate kinase. *Biochem. Soc. Trans.* **9**, 212-213.

Muirhead H., Clayden D.A., Barford D., Lorimer C.G., Fothergill-Gilmore L.A., Schiltz E. Schmitt W. (1986) The structure of cat muscle pyruvate kinase. *EMBO J.* **5**, 475.

Neubaner B., Lakonek M., Winker M., Parke M. Hofferbert S. y Schröter W. (1991) Point mutation in the L-type pyruvate kinase gene of two children with hemolytic anemia caused by pyruvate kinase deficiency. *Blood* **77**, 1871-1875.

Noguchi T. Yamada K. Inoue H. Matsuda T. and Tanaka T.(1987) The L-type and R-type isozymes of rat pyruvate-kinase are produced from a single gene by use of different promoters. *J. Biol. Chem.* 14366-14371.

Oberfelder R.W.,Lucy L.-Y. and Lee J.C. (1984) Thermodynamic Linkages in Rabbit Muscle Pyruvate Kinase: Kinetic, Equilibrium and Structural Studies. *Biochemistry* **23**, 3813-3821.

Passow H. (1986) Molecular aspects of band 3 protein-mediated anion transport across the red blood cell membrane. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **103**, 61-203.

Pastore L., Della Morte R., Friso G. Alfinito F. Rotoli B and Salvatore F. (1995a) Alterazioni molecolari in pazienti affetti da deficit di piruvato chinasi. 35 *Congresso Nazionale Società Italiana di Ematologia*. P077 (Abstract).

Pastore L., Della Morte R., Friso G. Alfinito F. Rotoli B and Salvatore F. (1995b) Alterazioni della forma R del gene della piruvato chinasi: presenza di una nuova mutazione (G1523) e bassa frequenza della A1529 in un campione dell'Italia meridionale. *Analisi del DNA* (Abstract).

Perutz, M.F. (1990) Mechanisms regulating the reactions of human hemoglobin with oxygen and carbon monoxide. *Ann. Rev. Physiol.*, **52**, 1-25.

Rich, I. N. (1987) Molecular and Cellular Aspects of Erythropoietin and Erythropoiesis. *Cell Biology*, vol.8. Springer-Verlag. Berlin.

Robinson M. A., Loder P. B. and De-Gruchy G.C. (1961) Red-cell metabolism in non-spherocytic congenital haemolytic anaemia. *Brit. J. Haematol.* **7**, 327-339.

Rouger H., Valentin C., Craescu C.T., Galacteros F. and Cohen-Solal M. (1996) Five unknown mutations in the LR pyruvate kinase gene associated with severe hereditary nonspherocytic haemolytic anaemia in France. *British Journal Haematology* **92**, 825-830.

- Sambrook, J. Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning* .1. (A laboratory manual) 2nd. de Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Sanger F., Nicklen F.S. and Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463-5467.
- Schuster R. and Holzhutter H.G. (1995) Use of mathematical models for predicting the metabolic effect of large-scale enzyme activity alterations. applications to enzyme deficiencies of red blood cells. *Eur. J. Biochem.* **229**, 403-418.
- Selwyn J.C. and Dacie J.V. (1954) Auto-hemolysis and other changes resulting from the incubation "in vitro" of red cells from patients with congenital hemolytic anemia. *Blood* **9**, 414-438.
- Tanaka K.R. and Paglia D.E. (1971) Pyruvate kinase deficiency. *Semin. Hematol.* **8**, 367-369.
- Tanaka K.R. (1985a) Disorders associated with enzymopathies of the Embden-Meyerhof pathway, pp. 249-252. In: Valentine W.N., moderator. Hemolytic anemias and erythrocyte enzymopathies. *Ann. Intern. Med.* **103**, 245-257.
- Tanaka K.R. (1985b) Hemolytic anemia due to abnormalities of enzyme of anaerobic glycolysis and nucleotide metabolism. In: *Current therapy in Hematology-Oncology*. Brain M.C. and Carbone P.P. (eds). Philadelphia. USA.
- Tanaka K.R. y Paglia D.E. (1995) Pyruvate kinase and other enzymopathies of the erythrocyte. In: *The metabolic basis of inherited disease* Vol.2. Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S. and Valle D. (eds) MacGraw Hill. New York, 3485-3511.
- Tani K., Fujii H. and Nagata S. (1988a) Human-liver type pyruvate-kinase complete amino-acid sequence and the expression in mammalian-cells. *Pro. Natl. Acad. Sci. (USA)* **85**, 1792-1795.
- Tani K., Yoshida M.C., Satoh H., Mitamura K., Noguchi T. and Tanaka, T. (1988b) Human M₂-type pyruvate kinase: cDNA cloning chromosomal assignment and expression in hepatoma. *Gene* **73**, 504-509.
- Tani K., Yoshikubo T., Ikekuchi K., Takahashi K., Tsuchiya T., Shimane M., Ogura H., Tojo A. and Ozawa K. (1994) Retrovirus-mediated gene transfer of human pyruvate kinase (PK) cDNA into murine hematopoietic cells implications for gene-therapy of human PK deficiency. *Blood* **83**, 2305-2310.
- Tanphaichitr V.S., Suvatte V. Issaragrisil S., Mahasandana C., Veerakul G., Chongkolwatana V., Waiyawuth W. and Ideguchi (2000). Successful bone marrow transplantation in a child with red blood cell pyruvate kinase deficiency. *Bone Marrow Transplant* **26**, 689-690
- Thomas P.J., Qu B.H. and Pedersen P.L. (1995) Defective protein folding as a basis of human disease. *Trends. Biol. Sci.* **20**, 456-459.
- Treacy M.N., He X. and Rosenfeld M.G. (1991) 1-Pou: a POU domain protein that inhibits neuron specific gene activation. *Nature* **350**, 577-584.
- Uenaka R., Nakajima H., Noguchi T., Imamura K., Hamaguchi T., Tomita K.,

- Yamada K., Kuwajima M., Kono N., Tanaka T. and Matsuzawa Y. (1995) Compound heterozygous mutations affecting both hepatic and erythrocyte isozymes of pyruvate kinase. *Biochem Biophys Res Commun* **208**, 991- 998.
- Ingram V.M. (1956) A specific chemical difference between the globins of normal humans and sick cell anaemia haemoglobin. *Nature* **178**, 792-794.
- Valentine W.N. , Tanaka K.R. and Miwa S. (1961) A specific erythrocyte glycolytic enzyme defect (pyruvate kinase) in three subjects with congenital nonspherocytic hemolytic anemia. *Transactions of the Association of American Physicians* **74**, 100-110.
- Valentine W.N., Tanaka K.R. and Paglia D.E. (1985) Hemolytic anemias and erythrocyte enzymopathies. *Ann. Intern. Med.* **103**, 245-257.
- Valentine W.N., Tanaka K.R. and Paglia D.E. (1989) Pyruvate kinase and other enzyme deficiency disorders of the erythrocyte. In: *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. Scriber C.R., Beaudet, A.L. and Sly W.S. (eds) 6th.ed. New York.
- Van Solinge W.W. , Kraaijenhagen R.J. Rijkse G., Van Wijk R., Stoffer B.B., Gajhede M. and Nielsen F.C. (1997) Molecular Modelling of Human Red Cell Pyruvate Kinase: Structural Implications of a Novel G₁₀₉₁ to A Mutation Causing Severe Nonspherocytic Hemolytic Anemia. *Blood* **12**, 4897-4995.
- Vives-Corrons J.L., Marie J., Pujades M.A. and Kahn A. (1980). Hereditary erythrocyte pyruvate-kinase (PK) deficiency and chronic hemolytic anemia: clinical, genetic and molecular studies in six new Spanish patients. *Hum. Genet.* **53**, 401-408.
- Walker O., Chia W.N. and Muirhead H. (1992) Key residues in the allosteric transition of *Bacillus stearothermophilus* pyruvate kinase identified by site-directed mutagenesis. *J. Mol.Biol.* **228**, 265-270.
- Whitney K.M. Goodman S.A. Bailey E.M. Lothrop C.D. Jr.(1994) The molecular basis of canine pyruvate kinase deficiency. *Exp Hematol* **69**, 866-870.
- Wintrobe M.M. (1985) Hematology, The Blossoming of a Science: Study of Inspiration and Effort. Lea & Febiger. Philadelphia. USA.
- Yoshikawa,H. and Rapoport, S. M. (1974) *Cellular and Molecular Biology of Erythrocytes*. Medical and Technical Publications Co., London.
- Zanella A., Colombo M.B., Rossi F., Merati G. and Sirchia G. (1989) Congenital non-spherocytic haemolytic anaemias. *Haematologica* **74**, 387-396.
- Zanella A., Bianchi P., Baronciani, L., Zappa, M., Bredi E., Vercellati C., Alfinito F., Pelissero G. and Sirchia G. (1997) Molecular characterization of PK-LR gene in pyruvate kinase-deficient Italian patients. *Blood* **10**, 3847-3852.
- Zanella A. and Bianchi P. (2000) Red cell pyruvate kinase deficiency: from genetics to clinical manifestations. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* **13**, 57-81.
- Zanella A., Bianchi P., Fermo E. Iurlo A., Zappa M., Vercellati C., Boschetti C., Baronciani, L., and Cotton F. (2001)

Molecular characterization of PK-LR gene in sixteen pyruvate kinase-deficient patients. *Brit. J. Haematol.* **113**, 43-48

Zarza R., Alvarez, R., Pujades, A., Nomdedeu, B., Carrera, A., Estella, J., Remacha, A., Sánchez, J.M., Morey, M., Cortés, T., Pérez Lungmus, G., Bureo, E., and Vives Corrons, J.L. (1998) Molecular characterization of PK-LR gene in pyruvate kinase deficient Spanish patients. *British Journal Haematology* **103**, 377-382.

Zarza R., Moscardo M. Alvarez R., García J. Morey M. Pujades A. and Vives-Corrons J.L. (2000) Co-existence of hereditary spherocytosis and a new red cell pyruvate kinase variant: PK Mallorca. *Haematologica* **85**, 227-232.

Zerez C.R. and Weiss R.L. (1987) Impaired nicotinamide adenine dinucleotide synthesis in pyruvate kinase-deficient human erythrocytes: a mechanism for decreased total NAD content and a possible secondary cause of hemolysis. *Blood* **4**, 999-1005.