



Centro de Investigación en
Alimentación y Desarrollo, A.C.

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y BIOFÍSICA DE
NUCLEÓSIDO DIFOSFATO CINASA DE CAMARÓN
BLANCO (*Litopenaeus vannamei*)**

POR:

IDANIA EMEDITH QUINTERO REYES

TESIS APROBADA POR:

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros de comité designado para revisar la tesis de Idania Emedith Quintero Reyes, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias



Dr. Rogerio R. Sotelo Mundo
Director



Dr. Francisco J. Castillo Yáñez
Co-Director



Dra. Gloria M. Yepiz Plasencia
Asesor



Dra. Adriana T. Muhlia Almazán
Asesor



Dr. Jesús Hernández López
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se de crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dr. Pablo Wong González
Director General

FINANCIAMIENTO

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología Molecular de Organismos Acuáticos, de la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. El apoyo financiero para su realización fue proporcionado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), a través del proyecto CB-2009-01-131859 "Inhibición del metabolismo de nucleótidos como estrategia contra el virus de la mancha blanca del camarón" y de la beca de estudios de doctorado otorgada por CONACYT.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo brindado durante ésta etapa fundamental de mi desarrollo académico.

De igual manera se agradece al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) por la oportunidad de continuar preparándome como profesionista, además de todas las facilidades y apoyos otorgados para que este trabajo se pudiera llevar a cabo.

Además al apoyo financiero para la realización de esta tesis que fue proporcionado a través del proyecto CB-2009-01-131859 "Inhibición del metabolismo de nucleótidos como estrategia contra el virus de la mancha blanca del camarón" el cual fue proporcionado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Quiero agradecer infinitamente al Dr. Rogerio R. Sotelo Mundo por su guía, consejos y formación académica.

A las observaciones, asesorías y sugerencias tan atinadas del Dr. Jesús Hernández López y la Dra. Adriana Muhlia Almazán.

A la maestra Karina García Orozco por su asesoría y paciencia. A la Dra. María Auxiliadora Islas por su amistad y contribuciones en mi formación académica.

Dra. Gloria Yepiz Plascencia agradezco de todo corazón esos momentos que me regaló de su valioso tiempo, lo cual me hizo crecer personal y académicamente.

Al Dr. Enrique Velázquez Contreras por la asesoría brindada en la parte de calorimetría de titulación isotérmica de este trabajo, la cual lo enriqueció infinitamente.

A la Dra. Rocío Sugich Miranda por su asesoría y apoyo en los análisis de calorimetría de titulación isotérmica, además por las facilidades otorgadas en el Departamento de Polímeros de la Universidad de Sonora, por su disponibilidad, consejos brindados y sobre todo por su amistad.

Al Dr. Enrique Rudiño Pinera por la disponibilidad y asesoría brindada en la parte de Cristalografía.

A la maestra Alma B. Peregrino por su disponibilidad, confianza y amistad.

A las maestras Gisela Robles, María Elena Lugo, Guillermina García, Dra. Tere Gollas, por sus finas atenciones.

A Gerardo Reyna, por las facilidades otorgadas en Biblioteca, thanks Gerard.

Al Dr. Ramón Pacheco por su asesoría y consejos en esta etapa.

A toda la Coordinación de Programas Académicos, Laura, Verónica, Argelia, Héctor, Aurora, Norma, Alejandra y Alfonso.

A mis compañeros de laboratorio Lalo, Max, Alonso, Monsterrat, Laura, Cindy, José Alfredo.

A Salvador Carrasco y a las gusanitas Magda Pacheco, Citla Colín y Claudia Berlanga, por todo su apoyo y amistad, mil gracias.

A mi tía Any (Dra. Ana María Calderón de la Barca) por sus finas atenciones, asesoría y facilidades otorgadas en su lab.

Finalmente quiero agradecer al Dr. Francisco J. Castillo Yáñez por su guía, confianza, consejos y paciencia que me ha regalado desde la licenciatura, mil gracias.

DEDICATORIA

A Dios por permitirme cumplir con una etapa más como profesionalista.

A mis padres Yosy y Juan, por ser la fuente de inspiración a mi superación como profesionalista y como humano. Por su amor, paciencia y confianza.

A mis hermanos, Oliver y Joan, por compartir este sendero conmigo.

A mis tíos Lupita y José Luis, por su apoyo y presencia.

A mi Tatito, al fin te cumplí.

ÍNDICE

	Páginas
APROBACIÓN	ii
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	iii
FINANCIAMIENTO	iv
AGRADECIMIENTOS	v
DEDICATORIA	viii
INDICE	ix
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABLAS	xiv
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xvii
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
Metabolismo de Nucleótidos	3
Biosíntesis de <i>novo</i> : Nucleótidos de Purinas	7
Biosíntesis de <i>novo</i> : Nucleótidos de Pirimidinas	12
Biosíntesis de Ribonucleótidos de Timina: <i>vía de novo</i> y de Rescate	14
Biosíntesis de Desoxirribonucleótidos: Reducción de Ribonucleótidos a Desoxirribonucleótidos	16
Análogos Nucleosídicos	18
Antivirales	18
Análogos Nucleosídicos no Fosforilados	20
Análogos Nucleosídicos Fosforilados	22
Enzimas Cinasas	24
Cinasas que Participan en la Fosforilación de Análogos Nucleosídicos	24

Nucleósido Difosfato Cinasa (NDK)	26
Nucleósido Difosfato Cinasas Humanas: Grupo I	31
Nucleósido Difosfato Cinasas Humanas: Grupo II	32
Nucleósido Difosfato Cinasa en Virus	33
Virus de la Mancha Blanca (WSSV)	34
Estrategias de Control	37
Tratamiento a base de productos naturales	37
Tratamiento a base de vacunas de ADN/ARN	38
JUSTIFICACIÓN	40
HIPÓTESIS	41
OBJETIVO GENERAL	42
OBJETIVOS PARTICULARES	42
MATERIALES Y MÉTODOS	43
Reactivos	43
Producción de la Proteína Recombinante NDK de <i>L. vannamei</i>	43
Metales (IMAC)	44
Ensayo de Actividad Específica de NDK de <i>L. vannamei</i> Frente a Desoxinucleótidos Difosfato Mediante Ensayo Enzimático Acoplado	45
Determinación de la Estructura Cuaternaria de NDK de <i>L. vannamei</i> Mediante Cromatografía de Exclusión Molecular	45
Determinación de Parámetros Termodinámicos de NDK de <i>L. vannamei</i> Frente a Desoxinucleótidos Difosfato Mediante Calorimetría de Titulación Isotérmica	46
Modelamiento <i>in silico</i> y Anclaje de NDK de <i>L. vannamei</i>	47
Determinación de Condiciones de Cristalización del Complejo NDK-dGDP	48
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
CONCLUSIONES	67
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
ANEXO I.-	74

Idania E. Quintero-Reyes, Karina D. García-Orozco, Rocío Sugich-Miranda, Aldo A. Arivizu-Flores, Enrique F. Velázquez-Contreras, Francisco J. Castillo-Yáñez, Rogerio S. Sotelo-Mundo (2012). Shrimp oncoprotein nm23 is a functional nucleoside diphosphate kinase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, **44**:325-331.

ANEXO II.-

82

Idania E. Quintero-Reyes, Alonso A. López-Zavala, Jesús S. Carrasco-Miranda, Karina D. García-Orozco, Enrique Rudiño-Piñera, Rogerio R. Sotelo-Mundo. Crystallization studies for a nucleoside diphosphate kinase from Pacific whiteleg Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Enviado a *Acta Crystallographica F*.

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura química de bases nitrogenadas	4
2	Esquema general del metabolismo de nucleótidos	6
3	Reacciones necesarias para la activación de la ribos-5-fosfato para generación de PRPP	8
4	Vía de <i>novo</i> para la biosíntesis de IMP a partir de PRPP	10
5	Biosíntesis <i>de novo</i> para la obtención de purinas a partir de IMP	11
6	Síntesis <i>de novo</i> de nucleótidos de pirimidina a partir de carbamoil fosfato	13
7	<i>Ruta de novo y del rescate</i> para la biosíntesis de nucleótidos de timina	15
8	Biosíntesis de desoxirribonucleótidos trifosfato a partir de ribonucleótido reductasa	17
9	Estructura química de análogos nucleosídicos (a,c) y desoxinucleótidos	19
10	Esquema representativo del mecanismo de acción de aciclovir (ACV)	21
11	Esquema representativo del mecanismo de acción de cidofovir	23
12	Representación esquemática de la fosforilación de nucleósidos naturales que participan en la vía del rescate en humanos	25
13	Modelo tridimensional del posicionamiento del sustrato en la cavidad catalítica de NDK	30

14	Número de granjas afectadas por WSSV durante el periodo 2004-2011	34
15	Representación esquemática de la morfología de WSSV	35
16	Análisis electroforético de la cinética de sobreexpresión de NDK de <i>L. vannamei</i> .	50
17	Análisis electroforético de fracciones provenientes de la purificación de NDK recombinante de <i>L. vannamei</i> mediante IMAC	51
18	Cromatograma obtenido a partir de cromatografía de exclusión molecular	55
19	Modelo estructural de NDK de <i>L. vannamei</i> obtenido mediante el paquete computacional MOE versión 2011.10	57
20	Modelo teórico del anclaje (<i>docking</i>) entre NDK de <i>L. vannamei</i> y deoxinucleótidos difosfato	61
21	Cristales del complejo de NDK-dGDP obtenidos en la solución de 0.2 M de acetato de magnesio tetrahidratado, pH 6.5 y PEG 8000 al 20%,	66

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Evaluación de la actividad específica de NDK recombinante de <i>L. vannamei</i> frente a desoxinucleótidos bifosfato.	53
2	Estructura cuaternaria de NDK en diferentes organismos modificado de (Lascu <i>et al.</i> , 2000)	59
3	Parámetros termodinámicos y constantes de unión de NDK de <i>L. vannamei</i> frente a desoxinucleótidos bifosfato obtenidos mediante calorimetría de titulación isotérmica	64

RESUMEN

La nucleósido difosfato cinasa (NDK, E.C.2.7.4.6) es una enzima que fosforila nucleósidos-difosfatos para generar nucleósidos-trifosfatos (NTPs), dicha función es de gran importancia para la replicación de ácidos nucleicos como el ácido desoxirribonucleico (ADN). La del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) se expresa durante la infección con el virus de la mancha blanca (WSSV), donde los NTPs generados por NDK pudieran ser utilizados para la replicación viral. En base a lo anterior, es conveniente investigar sobre las rutas metabólicas que producen los NTPs necesarios para la replicación viral, además de estudiar las características bioquímicas y biofísicas de la proteína NDK del camarón *L. vannamei* con la finalidad de bloquear la replicación del WSSV.

En este estudio se sobreexpresó la enzima NDK de forma recombinante y se determinó su actividad enzimática con los deoxi-nucleótidos dGDP, dADP, dTDP y dCDP. La mayor actividad se presentó con dTDP (19,344 U/mg de proteína) y la menor actividad con dGDP (5,505 U/mg de proteína). La afinidad de la enzima por los deoxi-nucleósidos difosfatos se determinó mediante calorimetría de titulación isotérmica (ITC) y se obtuvieron resultados en el rango micromolar ($K_d \approx 10^{-6}$) a excepción de dCDP, ya que este sustrato no mostró interacción detectable con la NDK mediante esta técnica. La estructura cuaternaria obtenida mediante cromatografía de exclusión molecular muestra que la NDK de *L. vannamei* es un trímero. Se obtuvieron cristales de la enzima por el método microbatch en complejo binario con dGDP, lo cual permitirá obtener la estructura tridimensional en estudios posteriores. Los datos obtenidos en este trabajo son de gran importancia ya que la enzima pudiera utilizar análogos nucleosídicos con la finalidad de bloquear la replicación WSSV

y el conocimiento de la estructura de la proteína NDK permitirá investigar a largo plazo la interacción de fármacos trifosforilados como terminadores de cadena de la replicación.

Palabras clave: Deoxinucleótidos, fosforilación, replicación viral, WSSV, *Litopenaeus vannamei*, cinasas.

ABSTRACT

Nucleoside diphosphate kinase (NDK) is an enzyme that has a key role in DNA replication as catalyzes the phosphorylation of nucleotides diphosphates to generate nucleotides triphosphates (NTP's). NDK has been described in the white leg pacific shrimp as a housekeeping enzyme expressed during the infection with the white spot syndrome virus (WSSV). In this study, NDK was obtained as a recombinant protein and its specific activity was measured towards deoxynucleotides diphosphates dGDP, dADP, dTDP and dCDP. NDK activity was 19, 344 U/mg of protein using dTDP as substrate while the lower activity was detected with dGDP. The affinity toward each substrate was determined by isothermal titration calorimetry (ITC) where the data were in the micro-molar range, except for dCTP which had no detectable interaction by this method. The quaternary structure, obtained by size-exclusion chromatography, of the *L. vannamei* NDK corresponds to a trimer. Crystals of NDK as a binary complex with dGDP were obtained using the microbatch method, and these crystals are essential for the determination of the three dimensional structure of the protein in further studies. Further work may be directed to test if NDK could phosphorylate nucleosides analogs with the aim of blocking the WSSV.

Keywords: Deoxynucleotides, phosphorylation, viral replication, WSSV, *L. vannamei*, deoxynucleoside kinases.

INTRODUCCIÓN

La industria camaronícola es una de las principales actividades económicas en el país, donde Sonora ocupa el primer lugar ya que ha generado derramas económicas alrededor de 4000 m.d.p. durante los últimos 4 años. Sin embargo, se ve amenazada por la presencia de patógenos como el virus de la mancha blanca (WSSV, *White Spot Syndrome Virus*, por sus siglas en inglés), el cual ataca a crustáceos como el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) provocando la pérdida del cultivo dentro de los primeros días de infección. De acuerdo a la literatura, durante la infección viral éste se apodera de la maquinaria del hospedero utilizando moléculas que participan en la biosíntesis de nucleótidos trifosfato (NTPs) los cuales son fundamentales para la replicación del ADN viral. Estudios realizados en el transcriptoma de *L. vannamei* identificaron el ADNc de una enzima que participan en la biosíntesis de NTP's, identificada como nucleósido difosfato cinasa (NDK) de acuerdo a su identidad con su homóloga en humano (Clavero-Salas *et al.*, 2007). NDK cataliza la tercera fosforilación de la cascada de fosforilaciones de desoxinucleósidos difosfato dependiente de ATP, con la finalidad de mantener la poza de NTPs lo cual, como ya se mencionó, es clave para la replicación del ADN (Leu *et al.*, 2009, Deville-Bonne *et al.*, 2010). Lo anterior la vuelve un blanco para la generación de fármacos antivirales ya que pudiera llevar a cabo el proceso de activación de análogos nucleosídicos (AN). En el mercado existen AN como el aciclovir y ganciclovir que son prodrogas dirigidas a cinasas virales, que requieren ser fosforiladas primero por enzimas como la timidina cinasa y posteriormente por otras cinasas como NDK. Sin embargo, hasta el momento no existen estrategias antivirales dirigidas a WSSV, siendo el objetivo de este

estudio obtener la NDK recombinante de *L. vannamei* para caracterizar su actividad bioquímica y unión a desoxinucleótidos difosfato, lo cual permitirá a largo plazo establecer estrategias para la generación de un fármaco dirigido a WSSV.

ANTECEDENTES

Metabolismo de Nucleótidos

Las bases nitrogenadas (Figura 1), tanto purinas como pirimidinas, son bases que forman la columna vertebral del ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN), de acuerdo a la combinación de cada base con una pentosa forma nucleósidos y la adición de un grupo fosfato genera nucleótidos. Los nucleótidos son moléculas que participan en diferentes procesos celulares como el metabolismo energético, llevan a cabo actividades como reguladores metabólicos así como precursores del ADN. La mayoría de los organismos pueden sintetizar nucleótidos a partir de precursores de bajo peso molecular en cantidades necesarias de acuerdo a las demandas celulares, y a esta ruta se le conoce como *vía de novo*. La ruta por la cual los organismos pueden sintetizar nucleótidos a partir de nucleósidos procedentes de la dieta o degradación enzimática de ácidos nucleicos se le conoce como *vía del rescate* o del salvamento (Figura 2). Se le conoce así, ya que involucra la utilización de purinas y pirimidinas que de otra forma se pudieran perder en la biodegradación (Mathews, 2002).

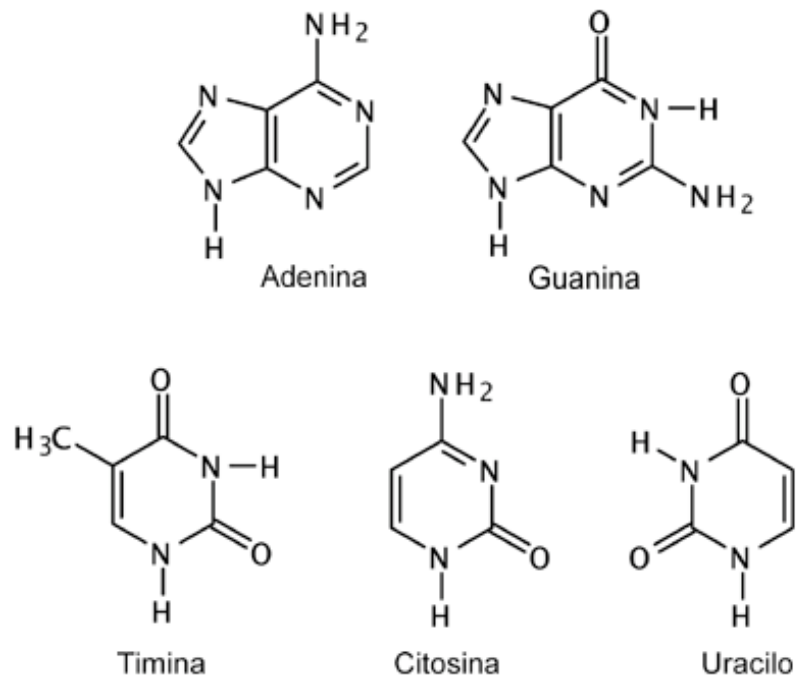


Figura 1.- Estructura química de las bases nitrogenadas (Mathews, 2002).

La degradación intracelular de ácidos nucleicos debido a vías de reparación del mismo o ingesta de los mismos en la dieta tiene como resultado que la vía del salvamento represente la ruta principal por la cual las bases nitrogenadas y los nucleósidos se vuelvan disponibles en el organismo. El proceso de degradación se inicia atacando los enlaces fosfodiéster por endonucleasas tales como la ribonucleasa pancreática o la desoxirribonucleasa. La acción de las enzimas mencionadas produce oligonucleótidos los cuales a su vez son modificados por exonucleasas como la fosfodiesterasa para generar mononucleótidos. Estos últimos son degradados hidrolíticamente por fosfomonoesterasas llamadas nucleotidasas, proceso en el cual, se generan ortofosfatos más el nucleósido correspondiente (Mathews *et al.*, 2002, Lehninger Albert, 1981).

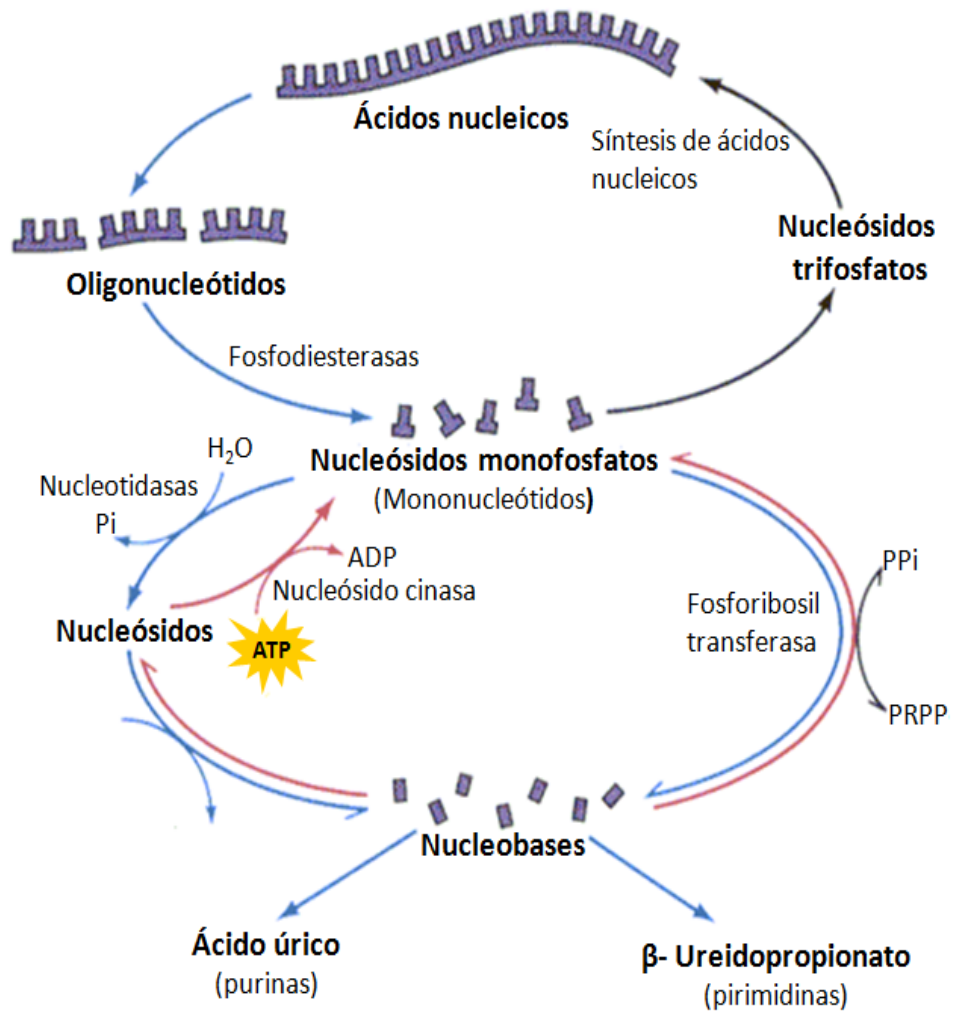


Figura 2.- Esquema general del metabolismo de nucleótidos (Mathews, 2002).

En la Figura 2 se muestran los precursores que participan en la formación de nucleótidos, con actividades específicas para la síntesis de ADN o ARN, actividades metabólicas o con función de coenzimas. Ambas vías tienen una función importante ya que se han convertido en blanco de la industria farmacéutica para generar fármacos dirigidos a enfermedades microbianas y parasitarias. Además, por ensayos de mutagénesis se ha logrado manipular algunas enzimas para la generación de anticuerpos monoclonales. Las enzimas llamadas fosforribosiltransferasas y el azúcar activado llamado 5-fosfo- α -D-ribosil-1-pirofosfato ó PRPP son centrales en ambas vías (Mathews *et al.*, 2002).

Biosíntesis *de novo*: Nucleótidos de Purina

El PRPP es un intermediario clave en la biosíntesis *de novo* de nucleótidos de purinas y pirimidinas. El cual se forma por la acción de la *PRPP sintetasa*, ya que provoca la transferencia del pirofosfato al carbón 1 de la ribosa-5-fosfato, además esta reacción es reversible por la acción de la *fosforribosiltransferasa* con la finalidad de generar monofosfatos y pirofosfato (Figura 3).

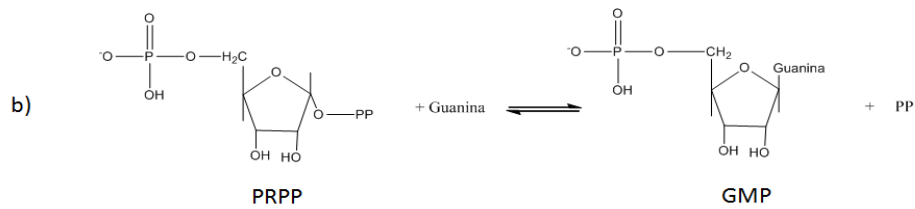
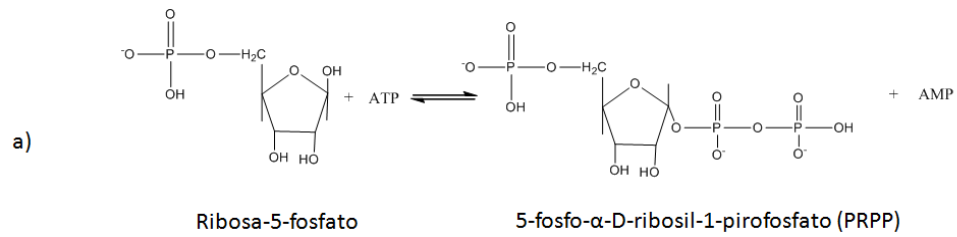


Figura 3.- a) Activación de la ribosa-5-fosfato para la generación de PRPP, molécula clave en la vía *de novo* y del salvamento. b) Generación de monofosfatos a partir de fosforribosiltransferasa (Mathews, 2002).

El PRPP es el primer intermediario para la generación del primer anillo purínico, la inosina-5-monofosfato (IMP) o ácido inosínico (Mathews *et al.*, 2002). De manera general, los pasos para la generación de IMP involucran la adición de un grupo amino provocando un cambio en la posición del carbono α de PRPP para generar 5-fosforribosilamina o PARA, los grupos aminos son donados por amidotransferasas. El metabolito 10-formil-tetrahidrofolato participa en la adición de unidades de carbono y las moléculas utilizadas para construir la estructura del anillo son glicina y fumarato, que intervienen en los últimos pasos para generar 5-aminoimidazol-4-ribonucleotido de carboxamida o AICAR y N-formilaminoimidazol-4-ribonucleótido de carboxamida o FAICAR. Posterior a FAICAR se lleva cabo una reacción de condensación la cual produce el primer compuesto púrico IMP (Figura 4).

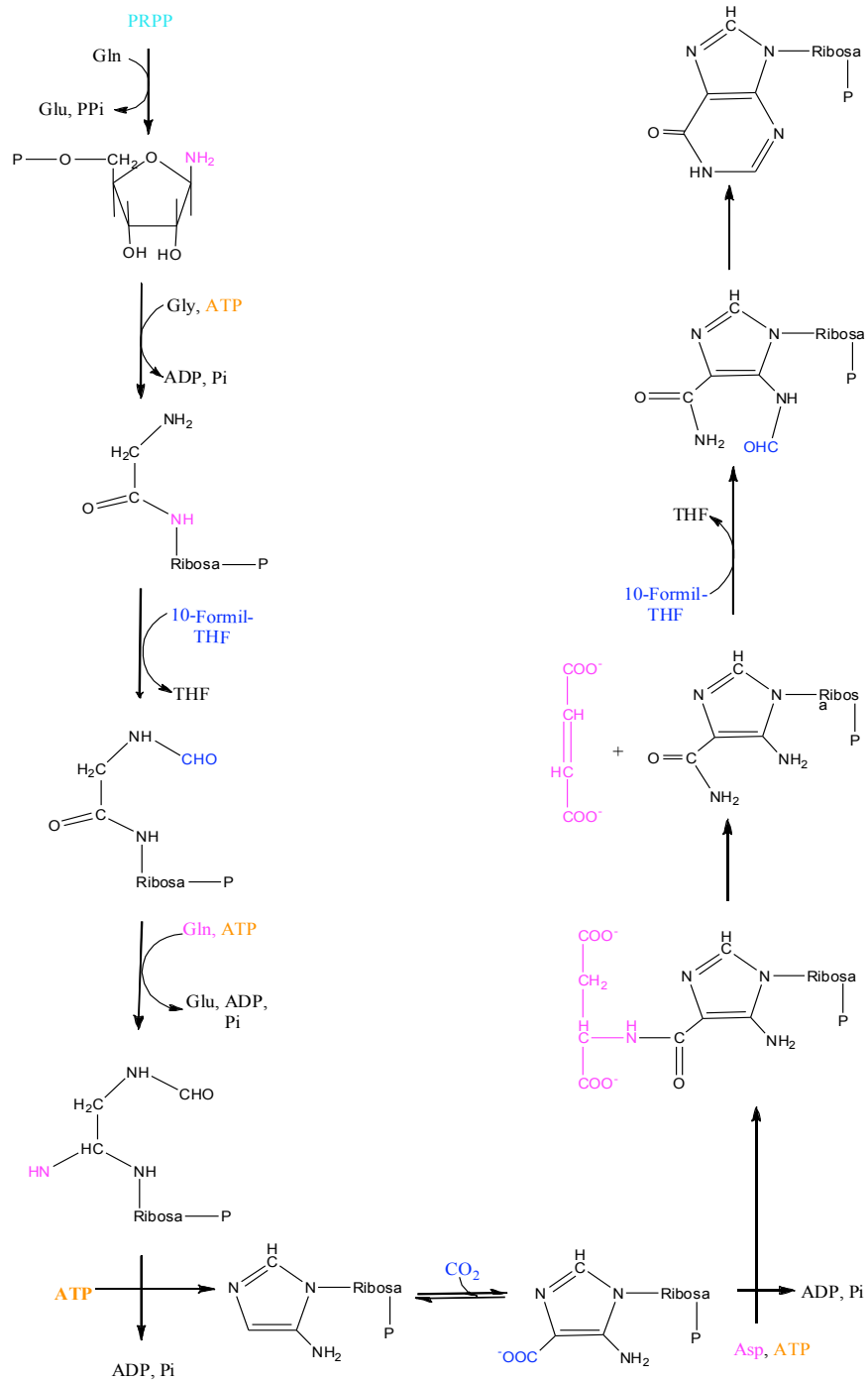


Figura 4.- Vía de novo para la biosíntesis de purina (IMP) a partir de PRPP. Se representa cada una de las reacciones involucradas en el proceso (Mathews, 2002).

La generación de IMP es un punto de divergencia para la producción de AMP y GMP, iniciando la vía para la generación de nucleótidos de guanina con la hidroxilación del anillo de IMP dependiente de NAD⁺ dando como resultado hipoxantina o XMP la cual es transformada a GMP por la intervención de amidotransferasa dependiente de glutamina. La generación de AMP involucra la transferencia de un nitrógeno del aspartato a IMP generando el intermediario adenilsuccinato; que seguida de una reacción de eliminación α, β produce AMP más fumarato (Mathews *et al.*, 2002) (Figura 5).

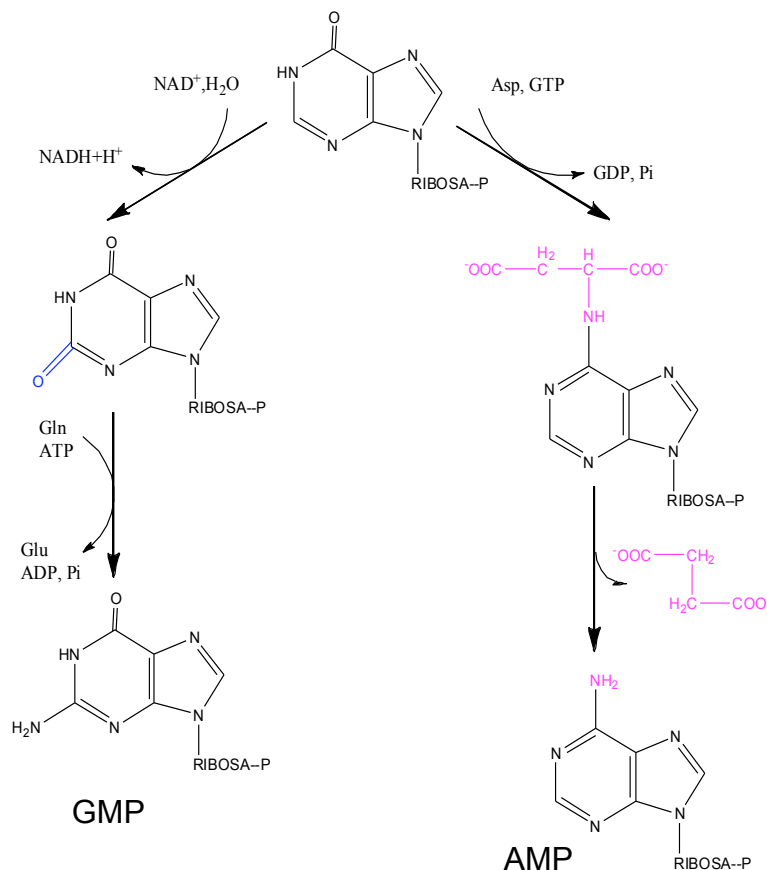
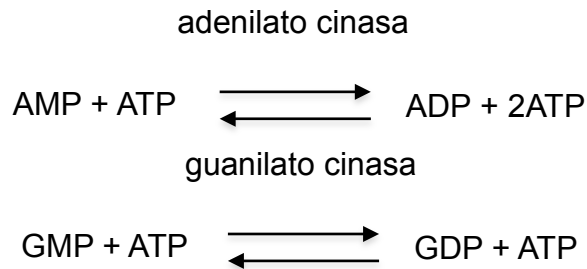


Figura 5.- Vía *de novo* para la obtención de AMP y GMP a partir de IMP (Mathews, 2002).

Durante el metabolismo, los nucleótidos son activos como trifosfatos, por medio de una cascada de fosforilaciones. Enzimas como la guanilato cinasa y la adenilato cinasa generan GDP y ADP, respectivamente. El ATP es el donador del grupo fosfato para generar los trifosfatos mediante la intervención de la enzima nucleósido difosfato cinasa o NDK (Mathews *et al.*, 2002).



Es importante mencionar que GMP y AMP controlan su propia formación por inhibición de la síntesis de adenilsuccinato. La acumulación de GTP tiende a promover el camino para la producción de nucleótidos de adenina. La conversión de XMP a GMP es dependiente de ATP, de esta manera la acumulación de ATP puede promover la síntesis de nucleótidos de guanina (Mathews *et al.*, 2002).

Biosíntesis *de novo*: Nucleótidos de Pirimidinas

La generación de nucleótidos de pirimidina es mucho más sencilla e involucra dos características distintivas con respecto a la generación de purinas. La primera es que el anillo pirimídico se ensambla como una base libre para posteriormente convertirse en un nucleótido, además que esta vía no se divide o ramifica en otras vías. Esta vía inicia con la formación de carbamoil fosfato mediante la enzima carbamoil fosfato sintetasa generando carbamoil aspartato, reacción catalizada por la enzima aspartato transcarbamoilasa. Posteriormente se produce orotidina monofosfato la cual es procesada a UMP o uridina monofosfato por la acción de la enzima orotidilato descarboxilasa. La enzima

UMP cinasa y la NDK provocan la formación de UTP al cual se transfiere un grupo amino por la CTP sintetasa para dar como producto final CTP o citidin trifosfato (Figura 6). La enzima aspartato transcarbamoilasa puede ser inhibida por el producto final de la vía CTP, y puede ser activada por ATP para mantener el balance de la biosíntesis de pirimidinas (Mathews *et al.*, 2002).

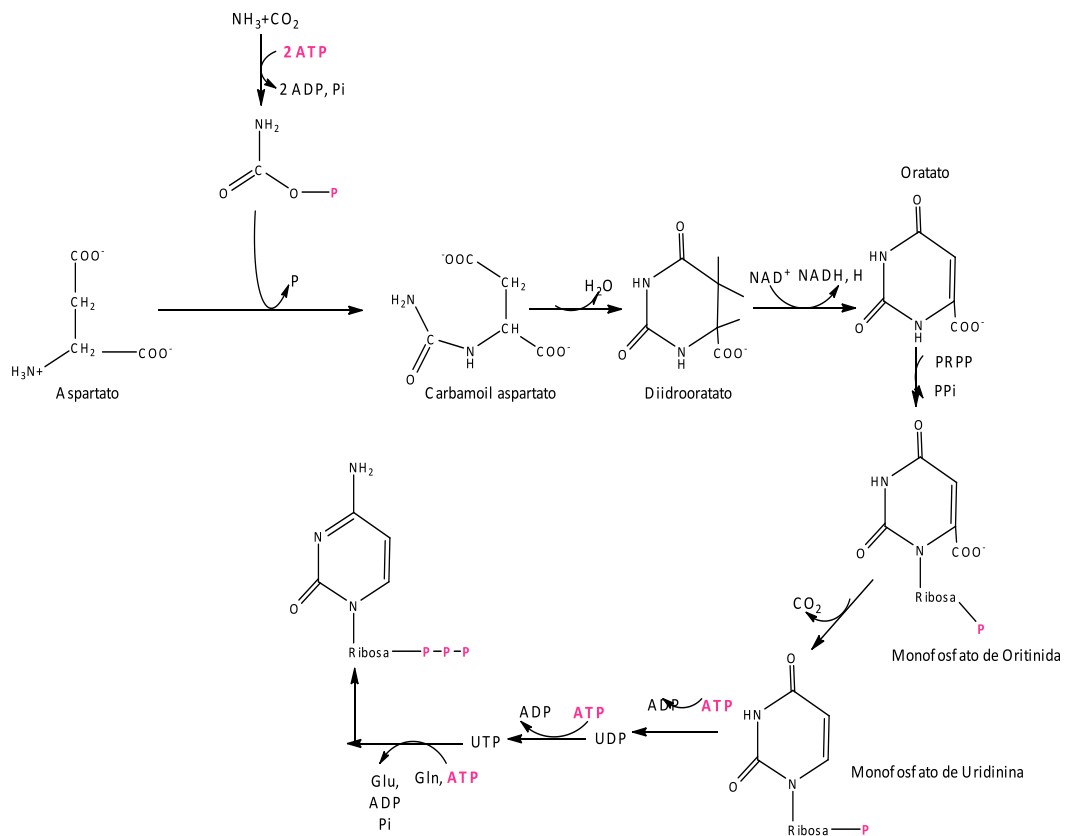


Figura 6.- Síntesis *de novo* de nucleótidos de pirimidinas, ruta que no se ramifica además de iniciar con una base libre llamada ácido orótico (Mathews, 2002).

Biosíntesis de Desoxirribonucleótidos de Timina: Vía *de novo* y de Rescate

La biosíntesis de desoxitimidina o dTTP empieza con desoxiuridina difosfato o dUDP (cuya formación se tratará más adelante). dUDP es fosforilado a dUTP el cual es transformado por una difosfohidrolasa (dUTPasa) a dUMP. La formación de dUMP a partir de dCDP, se da por la defosforilación de dCDP para formar dCMP, el cual sufre una desaminación por la dCMP desaminasa para generar dUMP. En este punto se genera una ramificación donde el dUMP generado es utilizado como sustrato para la formación de dTMP o desoxitimidina monofosfato. La reacción anterior es catalizada por la timidilato sintasa o TS. La TS adiciona un grupo carbono el cual es donado por la 5,10-metilentetrahidrofolato, además de un par de electrones para reducirlo (Mathews *et al.*, 2002). El dTMP formado es convertido a dTTP por dos fosforilaciones consecutivas (Figura 7).

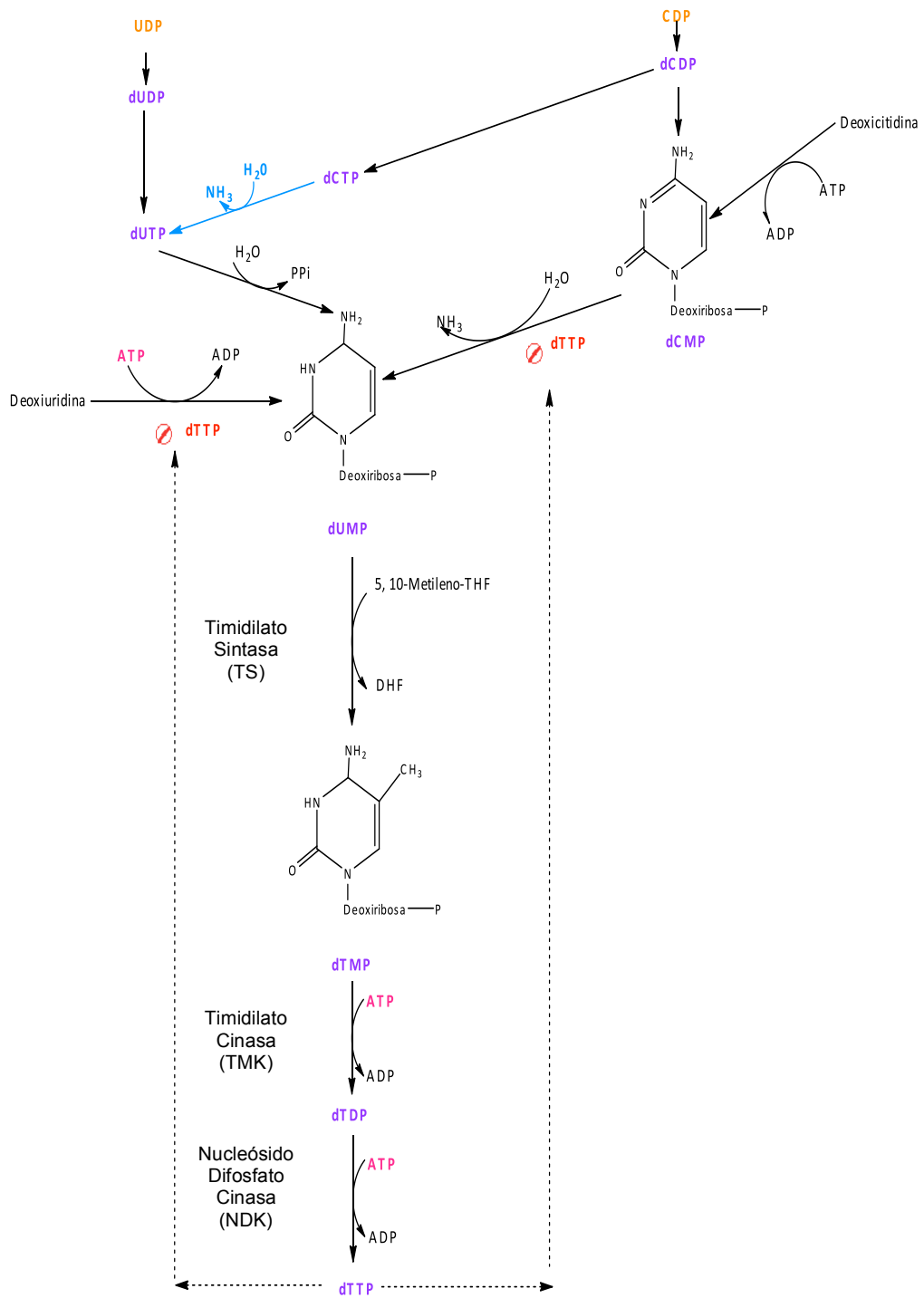


Figura 7.- Vía *de novo* y de rescate para la biosíntesis de nucleótidos de timina (Mathews, 2002).

Biosíntesis de Desoxirribonucleótidos: Reducción de Ribonucleótidos a Desoxirribonucleótidos

Los ribonucleótidos tienen varias funciones en el metabolismo de la célula, mientras que los desoxirribonucleótidos son utilizados solo como constituyentes del ADN. De acuerdo a lo anterior, su producción es regulada en relación a la síntesis de ADN (Mathews, 2002). La biosíntesis de los desoxirribonucleótidos inicia con la reducción de la ribosa a desoxirribosa, es decir, ocurre un reemplazo del hidroxilo del C2 por un ion hidronio. La enzima que reduce los cuatro desoxirribonucleótidos es la enzima ribonucleótido reductasa, la cual utiliza como sustratos a los ribonucleósidos difosfato. La ribonucleótido reductasa es un tetrámero $\alpha_2\beta_2$, el cual se divide en R1 (sitio catalítico) que corresponde a las α_2 y posee tres cisteínas y se llevan a cabo reacciones redox y R2 corresponde a β_2 . R2 posee una tirosina que actúa en conjunto con R1 además de poseer un átomo de oxígeno el cual forma un puente con un centro dinuclear de hierro (Mathews, 2002). En la Figura 8 se muestra la vía en la que interviene la ribonucleótido reductasa para generar los desoxinucleótidos a partir de nucleótidos difosfato.

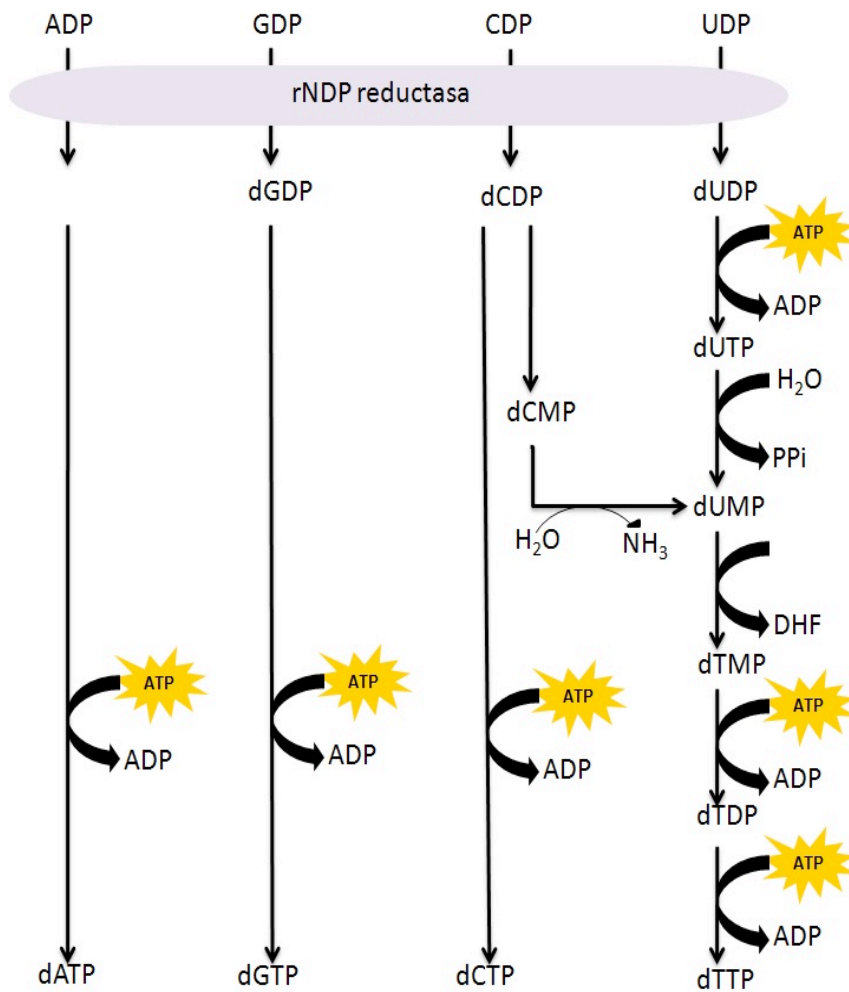


Figura 8.- Biosíntesis de desoxirribonucleótidos trifosfato a partir de ribonucleótido reductasa (Mathews, 2002).

Análogos Nucleosídicos

Antivirales

Desde hace cuatro décadas el uso de antivirales ha sido crucial para el manejo de distintas infecciones virales, incluyendo el virus del herpes simple (HSV, por sus siglas en inglés), virus de la hepatitis B (HBV), el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el citomegalovirus (CMV). Dentro de los antivirales se encuentran los derivados de nucleósidos o análogos nucleosídicos (AN). La actividad antiviral radica en que actúan inhibiendo a la ADN polimerasa viral así como a la transcriptasa reversa, enzimas que desempeñan un papel importante en el ciclo de replicación viral (De Clercq, 2009). De manera inicial, alrededor de 1960, los AN se identificaron como moléculas que actuaban en conjunto con el metabolismo de una batería de fármacos utilizados para el tratamiento de cáncer, ya que actuaban como antimetabolitos interfiriendo con el crecimiento de las células cancerígenas. El efecto terapéutico de los análogos nucleosídicos de manera invariable, provocaba daño a las células del hospedero, efecto secundario, que se creía que podía evitarse durante la eliminación del fármaco del cuerpo de los pacientes. Con la finalidad de disminuir los efectos secundarios se llevaron a cabo experimentos que incluían la modificación de la base heterocíclica así como la cavidad del azúcar por lo que se clasifican en dos grupos: análogos nucleosídicos fosforilados y análogos nucleosídicos no fosforilados (Deville-Bonne *et al.*, 2010). En la Figura 9 se muestran 2 análogos nucleosídicos y sus análogos naturales.

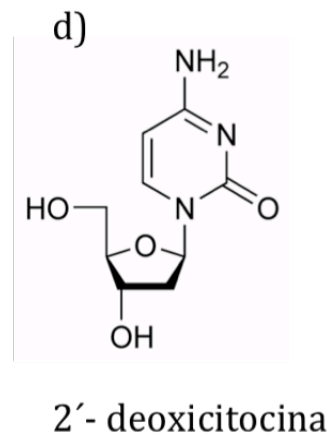
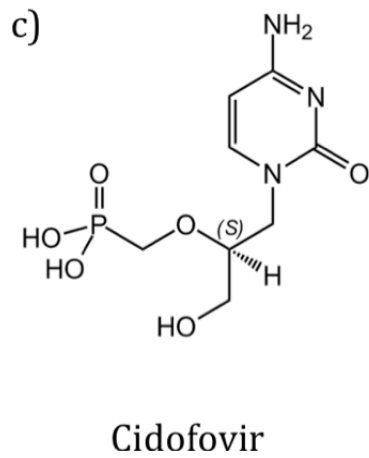
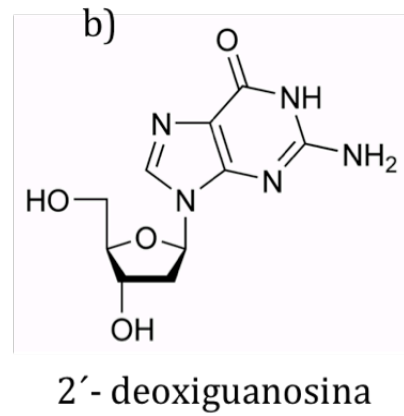
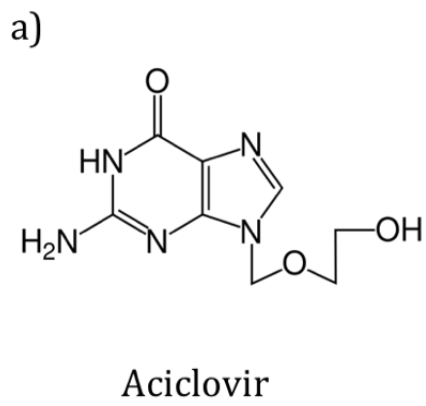


Figura 9.- Estructura química de análogos nucleosídicos (a, c) y desoxinucleótidos (b, d) (Deville-Bonne *et al.*, 2010).

Análogos nucleosídicos no fosforilados (AN).- la generación de este tipo de fármacos se inició con el descubrimiento de (S)-9-(2,3-dihidroxipropilo) adenina ó DHPA. DHPA fue utilizado para tratar las ampullas generadas durante el resfriado y fue considerado como un antiviral de amplio espectro; pero en realidad poseía una actividad muy débil frente varios virus, independientemente de su composición química. El mecanismo de acción se basa en su composición análoga a la adenosina, ya que éste ocupa el sitio de unión a adenosina en el sitio catalítico de la S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa, enzima que participa en la regulación de metilaciones de la S-adenosil-L-metionina (De Clercq, 2002). Este antiviral duró poco en el mercado como pomada para tratamiento tópico, sin embargo, fue una gran herramienta para investigaciones subsecuentes. Este tipo de fármacos tienen como blanco la ADN polimerasa viral y actúan como terminadores de la replicación. Para lograr lo anterior, primero tiene que ser fosforilado por varias enzimas cinasas de manera consecutiva para generar un metabolito activo trifosforado (De Clercq, 2009). La primera fosforilación generalmente la realizan enzimas virales, acción que permite que este tipo de fármacos sea dirigido a las células infectadas. Las fosforilaciones consecutivas se llevan a cabo por enzimas celulares como GMP (guanilato cinasa) y NDK (nucleósido difosfato cinasa). El aciclovir (ACV) es el estándar de oro dentro de los análogos nucleosídicos no fosforilados, y sirve para tratar el virus del herpes simple tipo 1 y 2 (HSV-1 y HSV-2, respectivamente). El mecanismo de acción descrito por Gertrude Elion se representa en la Figura 10 (De Clercq, 2001, 2002, 2009, De Clercq & Holy, 2005, Elion, 1983).

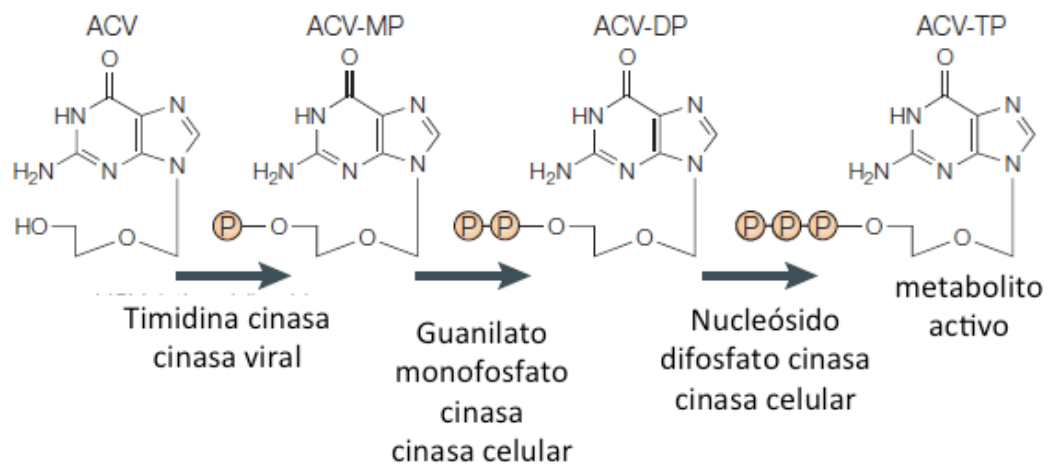


Figura 10.- Esquema representativo del mecanismo de acción de aciclovir (ACV), análogo nucleosídico de la guanina. Se muestran los pasos de fosforilación consecutiva que genera un metabolito trifosforado el cual termina con la replicación viral (De Clercq & Holy, 2005).

Análogos nucleosídicos fosforilados (ANP).- El mecanismo de acción de los análogos nucleosídicos fosforilados, a diferencia de los análogos nucleosídicos clásicos como zidovudine, aciclovir o penciclovir , no requiere de la primera fosforilación para su activación, la cual es catalizada por una nucleósido cinasa. En las células donde esta enzima es menos activa o que no la poseen, los análogos nucleosídicos no fosforilados son inactivos, mientras que los análogos nucleosídicos fosforilados son activos por la participación de nucleótido monofosfato cinasas (GMP cinasa o AMP cinasa) y la nucleósido difosfato cinasa (NDK), enzimas que los convierten a la forma di- y trifosfato, respectivamente (Figura 11) (De Clercq, 2001, 2002, 2009, De Clercq & Holy, 2005).

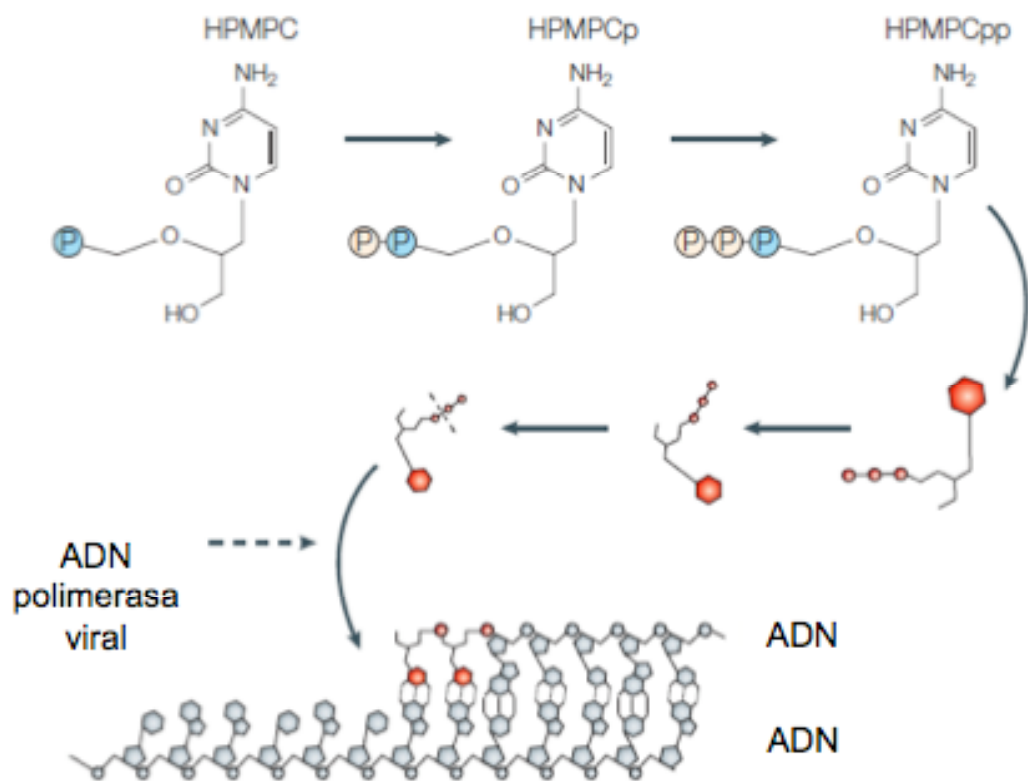


Figura 11.- Esquema representativo del mecanismo de acción de cidofovir (S-1-(3-hidroxi-2-fosfonilmetoxipropil) citosina o HPMPC, por sus siglas en inglés. Se observa que el análogo de manera inicial, posee en sus estructura un grupo fosfato, lo cual permite las 2 fosforilaciones consecutivas para la generación del metabolito trifosfato que termina con la replicación viral (De Clercq & Holy, 2005).

Enzimas Cinasas

Cinasas Que Participan en la Activación de Análogos Nucleosídicos

Las enzimas son en general proteínas con una capacidad de catálisis asombrosa. Estas moléculas llevan a cabo reacciones biológicas a altas velocidades, pueden actuar bajo condiciones suaves de reacción, es decir, temperaturas por debajo de los 100°C y actúan a pHs neutros. También poseen un alto grado de especificidad por su sustrato y su tipo de catálisis varía en respuesta a la concentración de otras sustancias diferentes al sustrato, es decir tienen capacidad de regulación catalítica (Alberts *et al.*, 2010). Los fármacos antivirales, principalmente análogos nucleosídicos como el 2'-,3'-dideoxi-3-azidotimidina (AZT), aciclovir, cidofovir, etc., tienen como blanco la ADN polimerasa o la transcriptasa reversa viral. Estos fármacos deben de ser procesados a su forma trifosfato, la cual compite con los sustratos naturales para la incorporación a la cadena de ADN en síntesis. Los trifosfatos, no pueden ser utilizados como fármacos debido a su polaridad, ya que no pueden atravesar la membrana celular, por tanto las fosforilaciones ocurren de forma intracelular. La activación de los fármacos, es decir, el procesamiento de nucleósidos a nucleótidos trifosfatos involucra fosforilaciones consecutivas (Figura 12). Este proceso generalmente se lleva a cabo por enzimas intracelulares llamadas cinasas, las cuales pertenecen a la vía del salvamento; aunque este proceso también lo pueden llevar a cabo cinasas virales (De Clercq & Holy, 2005, Deville-Bonne *et al.*, 2010).

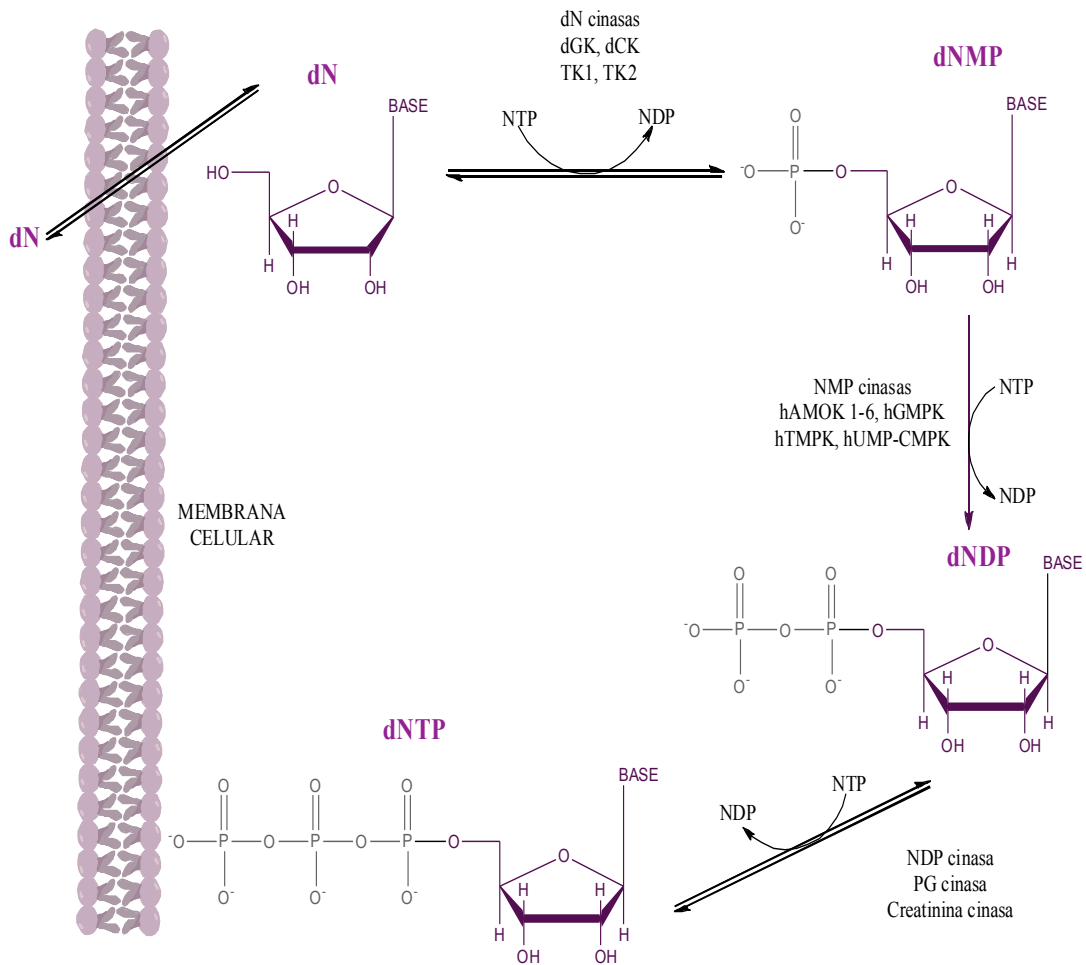


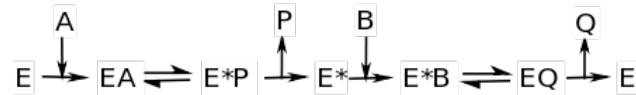
Figura 12.- Representación esquemática de la fosforilación de nucleósidos naturales que participan en la vía del rescate en humanos. Paso 1 desoxinucleósido cinasas llevan a cabo la primera fosforilación, paso 2, nucleótido monofosfato cinasas llevan acabo la segunda fosforilación, paso 3 nucleótido difosfato cinasas llevan acabo la tercera fosforilación (Deville-Bonne *et al.*, 2010).

Las cinasas de la vía del rescate y aquellas que son codificadas por genomas virales son proteínas pequeñas de alrededor de 17-45 kDa. La mayoría son monoméricas, aunque también existen dímeros, tetrámeros y hexámeros. No presentan un comportamiento alostérico, a excepción de desoxicitocina cinasa (dCK), timidina cinasa 1 y 2 de humano (hTK1 y hTK2, respectivamente) las cuales presentan una cooperatividad negativa frente a sus sustratos (Munch-Petersen *et al.*, 1991). En el caso de las desoxinucleósido cinasas, que son las que llevan a cabo la adición del primer fosfato, éstas son inhibidas por el producto trifosforado (dTTP) el cual se une como un bisustrato. Las cinasas catalizan la transferencia de un grupo fosfato de un donador que normalmente es el fosfato γ del ATP a un aceptor ya sea el hidroxilo 5' de un nucleósido o el fosfato α o β de un nucleótido. La molécula donadora o aceptora se une a dos sitios distintos normalmente, en una forma no ordenada, aunque la unión del primer sustrato facilita o inhibe la unión del segundo. Existen dos excepciones a lo descrito anteriormente, uno por la nucleósido difosfato cinasa la cual tiene un solo sitio de unión para ambos sustratos y la timidina cinasa del virus del herpes simple tipo 1, el cual une primero a la timidina antes que el ATP (Perozzo *et al.*, 2000).

Nucleósido Difosfato Cinasa

La nucleósido difosfato cinasa (NDK o NDP) fue descubierta en levaduras (Berg & Joklik, 1953) y en músculo de pichones (Krebs & Hems, 1953). La NDK cataliza la transferencia del fosfato γ de un nucleótido trifosfato a un nucleósido difosfato aceptor, la reacción incluye la formación de un intermediario, siendo la histidina de la enzima la que se fosforila de manera inicial. En base a lo anterior, la transferencia del grupo fosfato se lleva a cabo en dos pasos mediante el mecanismo conocido como “ping-pong” (Garces & Cleland, 1969). En este mecanismo los productos son liberados paso a paso.

Dos sustratos son involucrados en la reacción, el primer sustrato se une provocando la liberación de un producto y dejando a la enzima químicamente modificada. El segundo sustrato se une a la enzima modificada y es procesada para generar un segundo producto, provocando que la enzima regrese a su forma nativa. Lo anterior se puede representar de la siguiente forma:



donde E* denota la enzima modificada y P y Q representan los productos (Deville-Bonne *et al.*, 2010). Cada paso es totalmente reversible, la fosfohistidina es estable hasta por una hora en ausencia del sustrato aceptor (Deville-Bonne *et al.*, 2010). La reacción se puede seguir utilizando ensayos espectrofotométricos en combinación con enzimas acopladas o por ensayos fluorométricos.

Diferentes estudios hacen referencia a que ésta enzima es no específica y los niveles de su actividad varían de acuerdo a su localización celular. La actividad de esta enzima se ha detectado en el citosol (Cheng *et al.*, 1973), en el núcleo (Veer Reddy & Pardee, 1980), en la mitocondria (Herbert *et al.*, 1955, Jacobus & Evans, 1977) y asociada a la membrana plasmática (Kimura & Shimada, 1988). NDK es una enzima altamente conservada ya que estudios en organismos de diferentes especies muestran que tiene un sitio catalítico muy conservado con pequeñas variaciones en su estructura. Prácticamente una de las diferencias que presentan las NDKs es la asociación de su estructura cuaternaria (Lacombe *et al.*, 2000). Datos cristalográficos de NDK de humano, específicamente la isoforma B (Webb *et al.*, 1995) y D (Milon *et al.*, 2000), demuestran que se encuentra como hexámeros, similar a la NDK de *Drosophila melanogaster* (Chiadmi *et al.*, 1993) y de *Dictyostelium discoideum* (Morera *et al.*, 1994), mientras que la NDK de *Myxococcus* es tetramérica (Williams *et al.*, 1993). La estabilidad de las subunidades ya sean hexámeros o tetrámeros

radica en la forma en que se asocian las subunidades entre sí. Los tetrámeros se forman por la asociación de dos dímeros mientras que los hexámeros se asocian ya sea por un dímero de trímeros o un trímero de dímeros (Webb *et al.*, 1995). Las interfases de los dímeros están compuestas principalmente por hojas β . El rearrreglo trimérico de los dímeros involucra la participación de residuos del lazo (*loop*) llamado Kpn y la extensión de la cadena polipeptídica en el carboxilo terminal (Deville-Bonne *et al.*, 2010). En el caso de las enzimas que se ensamblan como hexámeros, los aminoácidos del extremo carboxilo terminal interactúan con el dímero vecino contribuyendo a la estabilidad del hexámero. En *Myxococcus* la NDK se ensambla como tetrámero, el segmento del carboxilo terminal es más pequeño e interactúa con la subunidad del mismo dímero y tiene características cinéticas particulares como su alta k_{cat} que por lo general excede a los 1000 s^{-1} . Esta enzima es considerada como la principal fuente en la generación de los cuatro nucleótidos trifosfato que son sustratos de la ADN polimerasa y en el caso de la generación de CTP y UTP necesarios para la ARN polimerasa. La biosíntesis de estos componentes es una función esencial en todos los organismos, lo cual la define como una enzima constitutiva. En algunos organismos como *Mycoplasma*, carecen del gen que codifica para NDK y la delección en *E. coli* o *S. cerevisiae* no previene su crecimiento; lo cual implica que otras enzimas cumplen con la producción de nucleótidos y desoxinucleótidos trifosfato necesarios para la célula (Bilitou *et al.*, 2009). En mamíferos incluyendo humanos, la NDK es el producto del gen nm23 (*non-metastatic*, por sus siglas en inglés) el cual incluye hasta 10 miembros. El nombre de nm23 deriva por su función de supresor de metástasis. En experimentos de líneas celulares tumorales en ratas, se detectaron niveles de ARN de nm23 más altos en células o tumores con bajo potencial a desarrollar metástasis (Steege *et al.*, 1988). El gen nm23-h1 muestra similitud al gen *awd* de *Drosophila* cuyo producto es NDK A, en el caso de nm23-h2 es similar a NDK B. NDK A y B poseen 88% de identidad y características enzimáticas similares.

Datos recientes reportan una interacción de NDK con caderinas, alfacateninas y plakoglobinas, que son proteínas de adhesión intracelular,

provocando la expresión elevada de NDK, lo cual sugiere que esto promueve la actividad supresora de tumores (Aktary *et al.*, 2010).

En estructuras cristalográficas disponibles en el banco de proteínas se incluyen complejos de la NDK con sustratos naturales o análogos, donde la histidina reactiva (H118 en las isoformas humanas) se encuentra en la parte inferior de la cavidad de unión, lo que permite que el nucleótido se posicione en la hendidura mediante los grupos fosfato (Figura 13). El anillo aromático de la base rodea la región hidrofóbica de las cadenas laterales pero los grupos polares no interaccionan con la proteína a excepción de la guanina, siendo el hidrógeno del grupo amino el que forma un puente con el carboxilo terminal de glutamato de la subunidad adyacente del hexámero. Lo anterior explica o define el hecho de que la NDK A y B de humano tienen una amplia gamma de sustratos (Morera *et al.*, 1995).

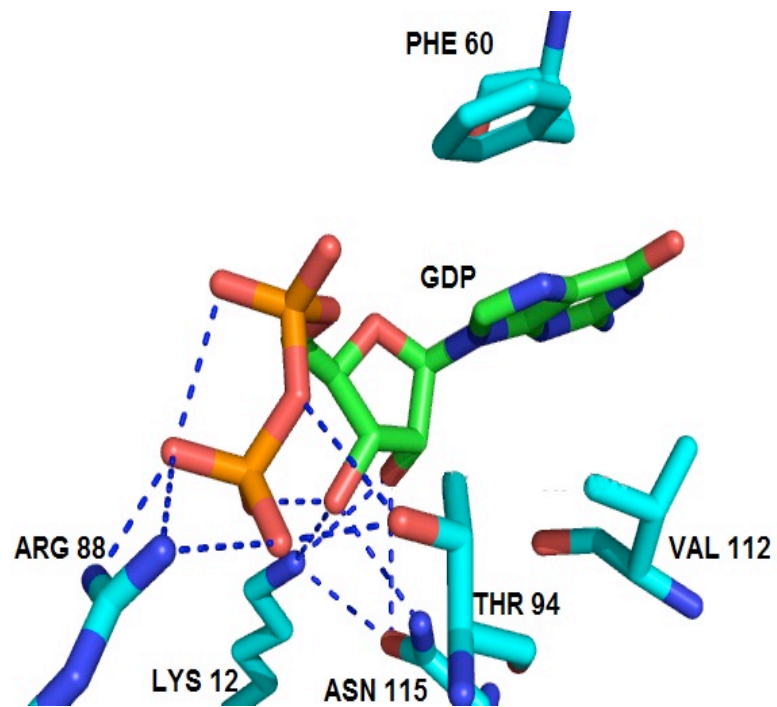


Figura 13.- Modelo tridimensional del posicionamiento de sustrato en la cavidad catalítica de NDK (Matte *et al.*, 1998).

De manera general, la NDK es una enzima cuya actividad varía dependiendo de su localización en la célula así como en el tejido en que se encuentre, además ya se ha mencionado que participa en diferentes procesos celulares (Bilitou *et al.*, 2009). A partir de una gran variedad de organismos hasta el momento, se han obtenido alrededor de 70 secuencias de ADNc de NDK mostrando que son enzimas conservadas. En humano se han documentado 8 genes denominados *nm23-h1-nm23-H8* (Lacombe *et al.*, 2000). Análisis filogenéticos definen que la familia de NDK se divide en dos grupos, los genes del primer grupo codifican para proteínas que generalmente tienen homólogos en vertebrados y presentan la actividad clásica de NDK. Este grupo incluye *nm23-H1 a nm23-H4* y comparten entre 58 y 88% de identidad. Los genes del segundo grupo abarcan *nm23-H5 a nm23-H8* que son más divergentes y presentan del 35 al 45% de identidad con el primer grupo y a excepción de *nm23-H6*, se encuentran predominantemente en testículos. Solo el producto del gen *nm23-H6* cataliza la reacción de transferencia del fosfato- γ a partir de un donador (Lacombe *et al.*, 2000).

Cinasas humanas del grupo I.- Estudios cristalográficos las definen como hexámeros y poseen el motivo (*motif*) NXXHG/ASD y tienen parámetros cinéticos similares. Todas poseen nueve residuos los cuales son importantes para que se lleve a cabo la catálisis y para la estabilidad, lo cual fue definido en base a estudios de mutagénesis dirigida. *nm23-H1* y *nm23-H2* pueden formar homo y hetero hexámeros lo cual pudiera definir su función celular. En condiciones fisiológicas normales, participan en proliferación celular, desarrollo y diferenciación. Sin embargo, el mecanismo no ha sido del todo definido (Gilles *et al.*, 1991). *Nm23-H3* fue descrita en leucemia crónica mielogénica como la proteína que posee una extensión en el amino terminal de 17 aminoácidos a diferencia de *nm23-H1* y *nm23-H2* y su coexpresión está inversamente relacionada con la diferenciación. Esta característica de su amino terminal define que es una enzima citosólica aunque no se precisa exactamente el lugar. La sobreexpresión de *nm23-H3* de médula ósea de ratón inhibe la diferenciación de granulocitos y provoca apoptosis, aunque varía dependiendo

de la línea celular en estudio. En condiciones normales se encuentra principalmente en cerebro, cerebelo y glándula pituitaria (Lacombe *et al.*, 2000). Nm23-H4 contiene una extensión de 33 aminoácidos en el amino terminal, señal que le permite su localización a mitocondria (Milon *et al.*, 1997). También una serina en la posición 129 equivalente a la mutación en el lazo (*loop*) Kpn en *Drosophila*, cuya mutación provoca la pérdida del color ciruela en los ojos de la mosca. Se sugiere que nm23-H4 se encuentra asociada como una porina, que permite el contacto entre la membrana interna y externa de la mitocondria.

Cinasas humanas del grupo II.- La NDK generada de estos genes son muy diferentes entre ellas y comparadas con las del grupo I, poseen un motivo (*motif*) en el lazo Kpn que es X-A-R/K, aunque no es estrictamente conservado a excepción de nm23-H6 y nm23-H8. Nm23-H5 es abundante en testículos y se encuentra en bajas concentraciones en cerebro y riñón; se sugiere que está involucrada en etapas tempranas de espermatogénesis (Yelick *et al.*, 1989). Secuencias homólogas se han encontrado en ratón y pez zebra entre otros. nm23-H6 tiene 7 aminoácidos en el amino terminal y 22 en el carboxilo terminal a diferencia de nm23-H1 y nm23-H2, y se encuentra en la mayoría de los tejidos humanos aunque en niveles bajos a diferencia de las enzimas del grupo I. El gen de nm23-H6 se ha visto implicado en una variedad de tumores malignos (Mehus *et al.*, 1999, Tsuiki *et al.*, 2000). Nm23-H7 posee una extensión de 85 aminoácidos en el amino terminal y carece de 13 residuos en el carboxilo terminal, se ha encontrado en hígado, corazón, cerebro, ovario, entre otros. El gen nm23-H7 se localiza dentro o cerca del locus susceptible a cáncer de próstata. La histidina catalítica es sustituida por una tirosina en nm23-H8 y en el amino terminal es homóloga a tioredoxina y es expresada en testículos principalmente (Lacombe *et al.*, 2000).

Nucleósido Difosfato Cinasa en Virus

En el 2003 se descubrió un virus de cadena doble de ADN que infecta amibas, llamado *Mimivirus*; hasta el momento es el virus más grande que se conoce. Es una partícula icosaédrica de 600 nm de diámetro y posee 911 genes. Contiene genes que no han sido encontrados en otros virus. Ejemplos de lo anterior son genes que codifican para la aminoacil ARNt sintetasa, componentes del aparato de traducción, enzimas que participan en la reparación del ADN entre otras. Lo anterior sugiere que el ciclo de vida de *Mimivirus* necesita componentes específicos que la célula hospedera no le provee. La identificación de la primera NDK homologa viral de *Mimivirus* de *Acanthamoeba polyphaga* (NDK_{apm}) fue de gran importancia ya que permitió demostrar su actividad a nivel molecular para conocer su función en el ciclo del virus y sus variaciones a nivel de secuencia con respecto a la de otros organismos (Janin *et al.*, 2000, La Scola *et al.*, 2003). La NDK_{apm} es un hexámero que posee una prolina conservada en la posición 95 así como una glicina en la posición 96 en el lazo Kpn que está involucrado en la estabilidad del oligómero. Presenta mayor actividad frente a desoxipirimidinas lo cual pudiera estar relacionado con el alto contenido de A+T en el genoma del virus (72%). Durante la replicación dTTP es el nucleótido limitante para ser incorporado a la cadena naciente de ADN, lo que sugiere que la NDK_{apm} pudiera haber evolucionado con el fin de tomar ventaja de la baja concentración de dTDP en la amiba (célula hospedera). Además, el genoma del *Mimivirus* codifica para enzimas involucradas en la biosíntesis de dTTP tales como la timidina cinasa (TK), como se mencionó previamente, la TK es responsable de la transformación de dT/dU a dTMP/dUMP (Mathews *et al.*, 2002, Jeudy *et al.*, 2006) y la timidilato sintasa (TS), la cual produce dTMP a partir de dUMP. Además posee su propia desoxirribonucleótido monofosfato cinasa para generar cualquier nucleótido difosfato y por lo tanto poder producir dTDP a partir de dTMP. Así también produce su propia ribonucleósido reductasa,

enzima responsable de la generación de ribonucleótido difosfato a desoxirribonucleósido difosfato como dGDP y dCDP.

Virus de la Mancha Blanca (WSSV)

El virus de la mancha blanca afecta a los camarones peneidos y es de los más devastadores ya que provoca hasta el 100% de mortalidad del cultivo dentro de los primeros días de infección (Lightner, 1996). Desde su primer reporte en Taiwan, en 1992, se ha expandido en todo el mundo provocando pérdidas económicas en la industria camaronícola. En Sonora, de acuerdo a la COSAES (Figura 14), para el 2011 se contaba con 75 granjas infectadas a diferencia del 2010 que se tenían 106. A pesar de que disminuyó el número de granjas infectadas, la infección por el WSSV sigue siendo un problema para la camaronicultura.

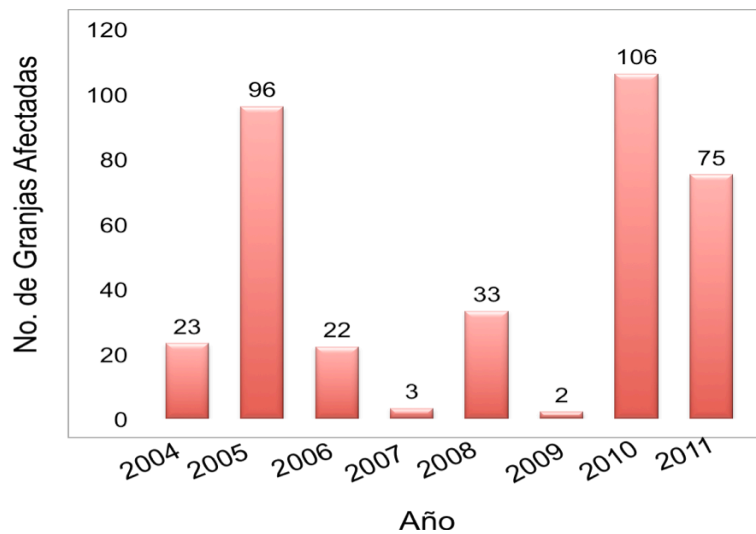


Figura 14.- Número de granjas afectadas por WSSV durante el periodo 2004-2011, información del informe final ciclo 2011, COSAES.

El WSSV es un virus con un genoma de doble cadena de ADN, de alrededor de 300 kpb, el cual codifica para 181 marcos de lectura (ORFs, por sus siglas en inglés, *open reading frame*) (Escobedo-Bonilla *et al.*, 2008, van Hulten *et al.*, 2001). Los viriones de WSSV presentan una morfología ovoide a baciliforme, con un apéndice cuya función no se conoce. El tamaño de los viriones varía entre 210 a 420 nm de largo y de diámetro de 70 a 167 nm. La envoltura viral es de 6-7 nm de grueso y presenta una estructura que asemeja a una membrana con bicapa lipídica, que posee un área entre la envoltura y la nucleocápside (Figura 15). Las dimensiones de la nucleocápside son de 180-420 nm de largo y 54-85 nm de diámetro indicando que se encuentra estrechamente empaquetada dentro del virión (Durand *et al.*, 1997, Leu *et al.*, 2009). De acuerdo a la información molecular y análisis filogenéticos de la ADN polimerasa del WSSV, se asignó a una nueva familia de virus llamada *Nimaviridae*, del género *Whispovirus* (Mayo, 2002a, 2002b, van Hulten *et al.*, 2001).

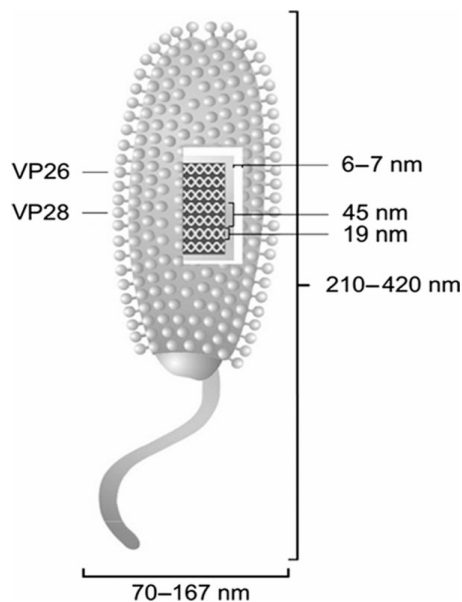


Figura 15.- Representación esquemática de la morfología de WSSV (Sánchez-Paz, 2010).

La envoltura del WSSV tiene al menos 35 proteínas diferentes, de las cuales VP28 y VP26 son las proteínas más estudiadas hasta el momento. El ORF 421 codifica para la proteína VP28 de la envoltura; varios estudios indican que esta proteína juega un papel importante en los pasos iniciales de la infección sistémica en camarón (van Hulten *et al.*, 2001). Además, existe evidencia sobre su papel como proteína de unión a la células de camarón lo cual provoca la internalización del virus al citoplasma (Yi *et al.*, 2004). VP28 a la vez contribuye al reconocimiento de receptores de la superficie de la célula de camarón debido a que posee varios sitios de glicosilación, aunque todavía no se ha demostrado (Tsai *et al.*, 2004). El gen *wsv* 311 codifica para la proteína VP26, proteína asociada de manera inicial a la nucleocápside, donde se mostró mediante un estudio comparativo de análisis de secuencias que VP26 era idéntica a p22. La proteína p22 está localizada en el espacio entre la envoltura y la nucleocápside, que actúa como unidor, '*linker*' o proteína de unión entre éstos dos compartimentos. Es decir, el N-terminal de la VP26 (que es una región hidrofóbica) ancla la envoltura, mientras que el C-terminal (contiene un secuencia hidrofílica) está unida a la nucleocápside. VP26 es capaz de unir actina o proteínas asociadas a actina por lo que se menciona que pudiera ayudar al WSSV a desplazarse al núcleo interactuando con actina o proteínas de unión a actina celulares, con la finalidad de que el virus esté cerca del sitio de transcripción y replicación.

Gracias al conocimiento generado sobre algunas proteínas en el WSSV se han generado alternativas o estrategias para el control de la infección. Sin embargo, es importante mencionar que en la actualidad no existe ningún tratamiento disponible para controlar la dispersión y la viremia ocasionada por el WSSV.

Estrategias de Control

Productos naturales.- Durante los últimos años se ha incrementado el interés de utilizar productos naturales como tratamiento para el WSSV, ya que se cree, que estimulan el sistema inmune para prevenir infecciones virales. Algunos compuestos como el metanol extraído de hierbas como *Cynodon dactylon*, *Aegle marmelos*, etc., ha sido utilizado como tratamiento de camarones infectados. En camarones tratados con extractos metabólicos de *C. dactylon*, incrementaron su supervivencia, presentando la actividad antiviral más fuerte. Otro ejemplo importante a mencionar es *Pongamia pinnata*, cuyos extractos de la planta originaria de la India, fueron exitosos para lograr una supervivencia de los camarones de hasta un 80% posterior a 15 días de infección (Rameshthangam & Ramasamy, 2007).

Tratamiento a base de vacunas virales.- La literatura reporta que los crustáceos al igual que otros invertebrados carecen de un sistema inmune adaptativo verdadero; por lo que su defensa se basa en mecanismos montados por la respuesta inmune innata. Por lo anterior, el desarrollo de vacunas en contra del WSSV no ha sido fácil, es decir, la falta de un sistema inmune de memoria así como el poco conocimiento sobre la etiología de la enfermedad han sido determinantes. Sin embargo, hay un caso que rompe con el esquema anterior donde se encontraron camarones (*P. japonicus*) sobrevivientes a un brote por WSSV 4 meses después del evento. En este caso se reportó una supervivencia del 94% sugiriendo que la supervivencia de los organismos previamente infectado desarrollaron una respuesta inmune (Venegas *et al.*, 2000). Estudios posteriores asocian semejante resistencia a un factor de neutralización presente en el plasma del camarón, aunque no caracterizado aún, sugiriendo que la respuesta inmune adaptativa en el camarón pudiera existir sin que se haya demostrado aún su mecanismo (Wu *et al.*, 2002).

Varios estudios utilizan proteínas recombinantes de la envoltura de WSSV con la finalidad de inducir una resistencia en el camarón. La inoculación

de *P. japonicus* con rVP26 mostró mayor resistencia a WSSV, mientras que en los organismos inoculados con rVP28 se observó 4% de disminución en la mortalidad (Namikoshi *et al.*, 2004). En la literatura se les llama vacunas a estas proteínas recombinantes, haciendo analogía a los antígenos que desencadenan la respuesta inmune en animales superiores, aun cuando estrictamente no lo son. Es importante mencionar que el tratamiento a base de vacunas es prometedor como una estrategia de control; sin embargo, se requiere demostrar los mecanismos de dicha protección.

Tratamiento a base de vacunas con ADN/ARN.- Este tipo de estrategia es de las más novedosas para el tratamiento de infecciones virales, donde puede contribuir en la activación del sistema inmune de los organismos inclusive; ya han sido probadas en una variedad de organismos. El ARN de doble cadena (ARNdc) actúa como una molécula que dispara la respuesta celular del hospedero frente a una infección viral. En crustáceos, específicamente en *P. vannamei*, hay evidencia sobre la inducción de respuesta frente al virus de Taura y WSSV con vacunas de ARNdc. De acuerdo a Robalino *et al.* (2004), camarones infectados con WSSV que fueron tratados con ARNdc (VP19) mostraron mayor protección a diferencia de camarones tratados con ARNdc distintos, lo cual indica que los camarones pueden utilizar protección patógeno-específica utilizando sistemas de ARNdc. Resultados similares se obtuvieron con ARNdc correspondientes a VP28 y VP281 en *P. chinensis* (Sánchez-Paz, 2010). Estudios recientes demuestran que camarones infectados con WSSV presentan protección de hasta 50 días gracias a la utilización de vacunas con plásmidos de ADN recombinante que codifican para la proteínas VP28 o VP281. Aquellos organismos vacunados con ADN recombinante correspondiente a VP28 mostraron niveles altos en la producción de superóxido dismutasa así como profenol oxidasa lo cual pudiera estar involucrado en el desarrollo de la resistencia contra el WSSV (Rajesh Kumar *et al.*, 2008). Plásmidos que contienen información de proteínas correspondientes a la nucleocápside (VP15 y VP35) no generaron ningún tipo de respuesta, dato

que se puede relacionar con el hecho de que la nucleocápside confiere protección al virus (van Hulten *et al.*, 2001).

De acuerdo a lo mencionado se puede decir que existen diferentes alternativas para el tratamiento de WSSV; sin embargo, hasta el momento no existe ninguna que sea definitiva. Además la cantidad disponible de ribo- y desoxinucleósido cinasas varía en las células y en todos los organismos. Los virus son capaces de redirigir el metabolismo de la célula hospedera de acuerdo a lo observado en bacterias infectadas por fagos; donde la nucleósido difosfato cinasa (NDK) es una de las principales enzimas del hospedero que provee una fuente de precursores necesarios para la síntesis de ADN viral (Mathews *et al.*, 2002).

JUSTIFICACIÓN

El camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) posee un gen cuya secuencia nucleotídica codifica para la enzima nucleósido difosfato cinasa (NDK), la cual no había sido caracterizada con técnicas bioquímicas y biofísicas. Esta enzima pudiera ser blanco del virus de la mancha blanca (WSSV) para poder llevar a cabo su replicación, debido a la función clave de NDK en la síntesis de nucleótidos. Por lo que es de gran importancia la investigación basada en el conocimiento molecular y catalítico de NDK de camarón blanco (*L. vannamei*) frente a sustratos específicos.

HIPÓTESIS

La enzima nucleósido difosfato cinasa (NDK) del camarón blanco (*L. vannamei*) es capaz de fosforilar los cuatro desoxinucleótidos difosfatos (dADP, dTDP, dCDP, dGDP) con la misma afinidad, lo cual es consistente con los parámetros termodinámicos y el anclaje (*docking*) de los mismos en el sitio activo de la enzima.

OBJETIVO GENERAL

Obtener la nucleósido difosfato cinasa (NDK) recombinante del camarón blanco (*L. vannamei*) y evaluar su actividad enzimática y unión a desoxinucleótidos difosfato.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Obtener la nucleósido difosfato cinasa (NDK) recombinante de camarón blanco (*L. vannamei*) y en base a su contenido de 6 histidinas purificarla mediante cromatografía de afinidad a metales.
- 2.- Determinar la actividad enzimática de la nucleósido difosfato cinasa (NDK) frente a sustratos específicos (dADP, dCDP, dGDP, dTDP) utilizando un ensayo enzimático acoplado.
- 3.- Determinar la estructura cuaternaria de la nucleósido difosfato cinasa (NDK) por cromatografía de exclusión molecular.
- 4.- Determinar parámetros termodinámicos, $K_{asoc.}$, ΔH , ΔS , ΔG , de la interacción de nucleósido difosfato cinasa (NDK) con dADP, dCDP, dGDP, dTDP mediante calorimetría de titulación isotérmica (ITC).
- 5.- Elaborar un modelo tridimensional por métodos computacionales (*in silico*) de nucleósido difosfato cinasa (NDK) unido a dADP, dCDP, dGDP, dTDP.
- 6.- Determinar condiciones experimentales para la generación de cristales de nucleósido difosfato cinasa (NDK) en complejo binario con dGDP.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Los reactivos utilizados fueron de grado analítico, bioquímico o de biología molecular según se requirió y fueron adquiridos de las firmas Sigma-Aldrich, Merck, J.T. Baker y USB.

Producción de la Proteína Recombinante NDK de *L. vannamei*

Se partió de la secuencia de aminoácidos depositada en el banco de genes con la clave de acceso DQ907945.1 (Clavero-Salas *et al.*, 2007). La secuencia codificante fue optimizada y producida sintéticamente en el vector pJexpress414 (DNA 2.0, U.S.A) con la finalidad de obtener una expresión óptima en *Escherichia coli*. Se agregó una etiqueta de histidinas en el constructo y un sitio susceptible a corte por proteasas (PreScission Protease). El constructo fue transformado en células químicamente competentes (*E. coli* BL21-SI, NOVAGEN, USA) las cuales fueron previamente transformadas con un plásmido bacteriano que contenía las chaperonas dnaK, dnaJ, grpE y el complejo groES/EL (pGJKE8, Takara, USA). El vector pJexpress 414 contiene un marcador de resistencia a ampicilina y un promotor T7 inducible por β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Las bacterias transformadas se crecieron en medio LB sin NaCl a 37°C en presencia de ampicilina y cloranfenicol a 50 μ g/mL y 20 μ g/mL respectivamente. Al alcanzar la densidad óptica de 0.6 a 600 nm, el

cultivo fue inducido con IPTG 1 mM para inducir la expresión de NDK y la T7 ARN polimerasa con cloruro de sodio 0.3 M y 5 mg/mL de L-arabinosa con la finalidad de inducir la expresión de las chaperonas. La inducción se llevó a cabo durante 5 horas y la biomasa bacteriana fue colectada por centrifugación a 5,000 x g durante 15 minutos a 4°C y el lavado de la misma fue con cloruro de sodio al 0.9% bajo las mismas condiciones.

La biomasa obtenida a partir de 1L de cultivo se almacenó congelada a -80°C hasta su uso. La biomasa fue resuspendida en buffer lisis (5 mL por gramo de biomasa), el cual contenía Na₂HPO₄ 20 mM pH 7.5, NaCl 0.5 M, DTT 1 mM, PMSF 0.5 mM y lisozima de clara de huevo 0.1 mg/ml concentración final. El lisado bacteriano se colocó en un baño con agua y hielo, para mantener la temperatura a 0°C, y ahí mismo se sonicó con 4 pulsos de 15 segundos con pausas de 1 min. El sonicado se clarificó mediante centrifugación a 35,000 x g durante 30 minutos a 4°C. La proteína de interés se encontró en la fracción soluble, y el precipitado se desechó. La cinética de expresión se evaluó en un gel de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturalizantes y reductoras comparando la fracción soluble de las bacterias antes y después de inducir el cultivo.

Purificación de NDK de *L. vannamei* Mediante Cromatografía de Afinidad a Metales, (IMAC)

El clarificado obtenido por centrifugación se trató con sulfato de estreptomicina al 10% (peso/volumen), se mezcló con agitación magnética suave en un baño de agua con hielo y se centrifugó a 35,000 x g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante contenía la proteína de interés, el cual se cargó a una columna His-Trap FF de 5 mL (GE Healthcare, USA) previamente equilibrada con (10 volúmenes de columna) búfer de fosfato de sodio 20 mM pH 7.4, cloruro de sodio 500 mM. La cromatografía se realizó en un equipo

automático (AKTA, GE LifeSciences Pharmacia). La NDK de camarón fue recuperada en el búfer de equilibrio adicionando imidazol 500 mM. Las fracciones obtenidas fueron de 3 mL y se analizaron en un gel de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturalizantes y reductoras. El gel fue teñido con nitrato de plata (Laemmli,1970) .

Ensayo de Actividad Específica de NDK de *L. vannamei* Frente a Desoxinucleótidos Difosfato Mediante Ensayo Enzimático Acoplado

La actividad de NDK de *L. vannamei* se determinó siguiendo la oxidación de NADH a NAD⁺ a 340 nm utilizando el ensayo enzimático acoplado previamente descrito (Kandeel & Kitade, 2010a). El volumen total de reacción fue de 1.5 mL, la mezcla contenía Tris-HCl 50 mM pH 7.5, ATP 2 mM, 5 µg de NDK de *L. vannamei*, MgCl₂ 5 mM, KCl 10 mM, NADH 0.14 mM, 2 unidades de fosfoenolpiruvato (PEP), 1.3 unidades de piruvato cinasa (PK) y 2.3 unidades de lactato deshidrogenasa (LDH). La reacción se inició al adicionar 0.5 mM del deoxinucleótido difosfato (dTDP, dADP, dCDP o dGDP). Una unidad se define como la conversión de 1 µmol de sustrato por segundo.

Determinación de la Estructura Cuaternaria de NDK de *L. vannamei* Mediante Cromatografía de Exclusión Molecular

Se determinó el estado oligomérico de NDK de *L. vannamei* utilizando una columna Superdex 200 (GE Healthcare), la cual fue previamente equilibrada con estándares moleculares. Los marcadores se prepararon en búfer de fosfatos 20 mM pH 7.4, NaCl 200 mM y 5% de glicerol. Los marcadores utilizados fueron albúmina (66 kDa), ovoalbúmina (44 kDa) además

de inhibidor de tripsina de soya (21.5 kDa). La cromatografía se realizó en un equipo automático (AKTA, GE LifeSciences Pharmacia).

Determinación de Parámetros Termodinámicos de NDK de *L. vannamei* Frente a Desoxinucleótidos Difosfatos Mediante Calorimetría de Titulación Isotérmica

Para determinar los parámetros de unión (*binding*) de NDK de *L. vannamei* frente a desoxinucleótidos difosfatos, se utilizó un microcalorímetro VP-ITC (Microcal, Inc., USA). 1.4 mL de NDK de *L. vannamei* con una concentración de 30 μM fue titulada con soluciones 1 mM de cada uno de los desoxinucleótidos difosfatos (dGDP, dCDP, dADP y dTDP). Todas las soluciones de NDK de *L. vannamei* fueron preparadas utilizando búfer diálisis (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, MgCl_2 2.5 mM). Cada uno de los experimentos se llevó a cabo a 30°C, la velocidad de agitación fue de 249 RPM. Se llevaron a cabo inyecciones de 10 μL con un espaciado de 300 s con la finalidad de asegurar el equilibrio entre cada inyección. El calor de dilución se determinó en base a dos experimentos, primero; el búfer diálisis de NDK fue titulado con cada nucleótido difosfato, segundo; la NDK fue titulada con búfer diálisis. Los datos fueron ajustados al modelo de unión a un solo sitio, donde se arrojan de forma directa y se obtiene la entalpía de unión (ΔH), la constante de asociación (K_a) y la estequiometría de unión (n). De manera indirecta mediante sustitución en la fórmula $\Delta G = RT \ln K$ se obtiene la energía libre de unión (ΔG) y los cambios en la entropía (ΔS) se obtuvieron de la fórmula $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$.

Modelamiento *in silico* y Anclaje de NDK de *L. vannamei*

El modelo teórico de la estructura molecular se realizó en base a la identidad que presenta a nivel de secuencia aminoacídica con la NDK de humano, dicha estructura se encuentra depositada en el PDB con la clave de acceso: 2HDV (Giraud *et al.*, 2006). El modelamiento y anclaje se llevó a cabo utilizando el programa MOE versión 2010.10 (Chemical Computing Group, Canada). El modelamiento molecular se inició con alineamientos múltiples de la secuencia de NDK con la finalidad de mejorar el modelo. Un total de 25 intermediarios se generaron bajo el campo de fuerza CHARMM27, el cual incluyó el ligando de ATP de la estructura templado. El modelo final fue refinado con los parámetros estándar del programa MOE. El anclaje de los desoxinucleótidos al sitio activo de la enzima fue utilizado para predecir la forma de unión y así poder correlacionarlo con la afinidad de la enzima hacia los mismos en base a su estructura. Para el anclaje, de manera inicial se eligió la conformación cerrada del sitio de unión de los nucleótidos de la NDK de *L. vannamei* sin seleccionar los residuos de Mg^{++} en el sitio de unión. Con la finalidad de obtener convergencia de las mejores posiciones de unión de ligando-NDK de *L. vannamei* se llevaron a cabo tres corridas estocásticas, independientes al anclaje. El método de triángulo-alfa se utilizó para determinar la orientación de los nucleótidos hacia el sitio activo de la enzima. Partiendo de 60,000 posiciones colectadas, solo 30 fueron retenidas de acuerdo a las funciones estándares aplicadas por MOE. Estas posiciones fueron sujetas a un paso de refinamiento con la finalidad de relajar las posiciones en el sitio activo, las cuales fueron seleccionadas de acuerdo a la función *dG-scoring*, la cual estima la contribución entálpica a la energía libre de la unión de las interacciones predichas en el posicionamiento del anclaje.

Determinación de Condiciones de Cristalización del Complejo NDK-dGDP

Se utilizó el kit comercial de cristalización de Hampton Research (Laguna Niguel, USA) Crystal Screen 1 y se utilizó la técnica de Microbatch. Se utilizaron distintas concentraciones de proteína (7, 10 y 13 mg), mezclando un microlitro de la solución de proteína más un microlitro de la solución de precipitación. Las placas se incubaron a 16°C y se hicieron observaciones cada semana con la finalidad de encontrar un cristal definido. Los cristales formados fueron recolectados en una micro-asa especial la cual se introdujo en la solución crioprotectante e inmediatamente fueron superenfriados en nitrógeno líquido para ser difractados posteriormente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo la co-expresión de NDK de *L. vannamei* con chaperonas permitió obtener la proteína recombinante de manera soluble (Figura 16), la cual fue purificada en un solo paso utilizando una columna de afinidad a metales o IMAC (por sus siglas en inglés) His-trap FF (Figura 17). Reportes en la literatura mencionan que las NDKs son enzimas oligoméricas donde su actividad es independiente de su estructura cuaternaria. Varias estructuras cristalográficas y estudios bioquímicos indican que en el caso de eucariotes como *Drosophila melanogaster*, *Homo sapiens* y *Mus musculus* las NDKs se encuentra formando hexámeros y en el caso de procariontes como *Myxococcus xhantus* se encuentra como trímero. En el caso de *Salmonella typhimurium* o *E. coli* se encuentra formando tetrámeros (Lascu *et al.*, 2000, Williams *et al.*, 1993).

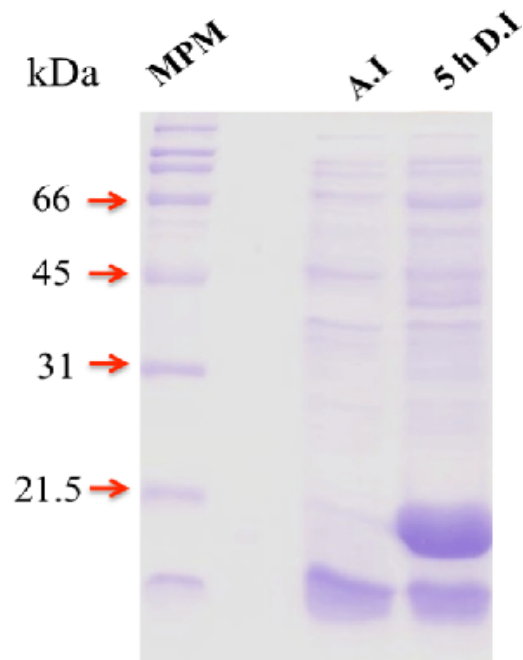


Figura 16. - Análisis electroforético de la cinética de sobreexpresión de NDK de *L. vannamei*. MPM: marcador de peso molecular de amplio rango, A.I. sobrenadante antes de inducción, 5 h D.I. : sobrenadante obtenido 5 horas después de la inducción con IPTG. Las bandas de alrededor de 14 kDa corresponden a lisozima de huevo utilizado para lisar bacterias. El gel fue teñido con azul de Coomassie R-250.

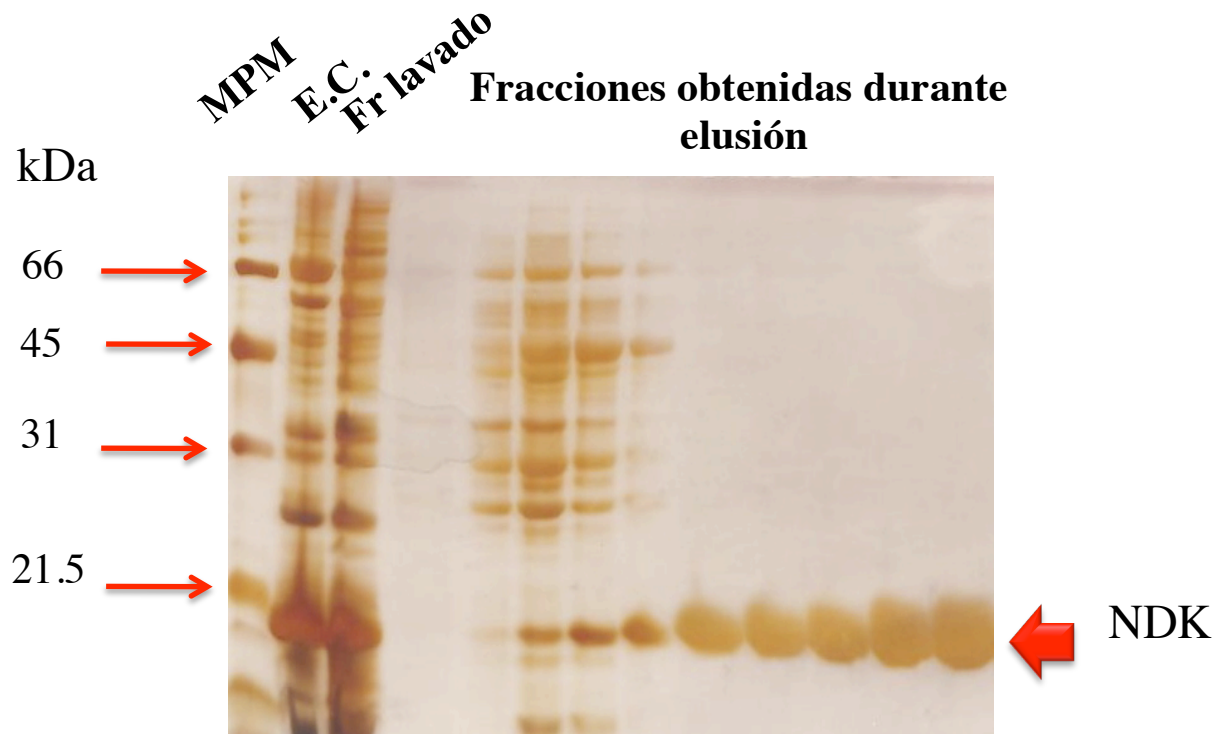


Figura 17.- Análisis electroforético de fracciones provenientes de la purificación de NDK recombinante de *L. vannamei* mediante IMAC. MPM: marcador de peso molecular de amplio rango; E.C.: extracto crudo del clarificado de *E. coli*, Fr lavado: fracción que no se unió a la columna; fracciones obtenidas durante la elusión: proteína recuperada en un gradiente de imidazol de 50 a 150 mM.

La actividad específica de la enzima se determinó mediante un ensayo enzimático acoplado y se utilizaron como sustratos cuatro desoxinucleótidos difosfato, dADP, dGDP, dTDP y dCDP. Se encontró que la NDK de *L. vannamei* es activa frente a todos los dNDPs, donde la mayor actividad la mostró frente a dTDP, seguida de dADP, dCDP y dGDP (Tabla 1). Pocos datos sobre la actividad específica de NDKs frente a los cuatro dNDPs han sido publicados. En el caso de la NDK mitocondrial recombinante de chícharo (*Pisum sativum*), ésta mostró una actividad específica de 2,700 U/mg frente a dCDP siendo 3.6 veces más grande el valor de NDK de *L. vannamei* frente a éste sustrato (9,648 U/mg) (Quintero-Reyes *et al.*, 2012) (Johansson *et al.*, 2004). La actividad específica de NDK mitocondrial de chícharo frente a dTDP fue de 5,100 U/mg mientras que la actividad de NDK de *L. vannamei* frente al mismo nucleótido difosfato es 3.8 veces mayor (19,344 U/mg). Valores frente al dTDP de NDK's como *Dictyostelium discoideum* y de humano (Nm23-H2) presentan valores menores que los de chícharo (2200 U/mg y 731 U/mg respectivamente) (Mesnildrey *et al.*, 1998, Postel *et al.*, 2002). La actividad de NDK de *L. vannamei* frente a dADP y dGDP fue de 14, 626 U/mg y 5,505 U/mg, respectivamente.

Tabla 1.- Evaluación de la actividad específica de NDK recombinante de *L. vannamei* frente a desoxinucleótidos difosfato.

<i>Actividad de Nucleósido Difosfato Cinasa después de su purificación por IMAC</i>	
SUSTRATO	<u>U/mg de proteína</u>
dTDP	19, 344
dADP	14, 626
dCDP	9, 648
dGDP	5,505

La actividad de las enzimas está relacionada con la estabilidad de su estructura cuaternaria lo cual ha sido demostrado mediante estudios de mutagénesis, las NDKs comparten similitud en su estructura primaria, secundaria y terciaria pero difieren en su estructura cuaternaria. En este trabajo se determinó la asociación multimérica de NDK de *L. vannamei* utilizando cromatografía de exclusión molecular (Superdex 200) donde la proteína eluyó en una sola fracción (Figura 18); es decir no muestra la presencia de otras especies, revelando que se encuentra como un trímero de 66 kDa. En la Tabla 2 se presentan algunas diferencias en la estructura cuaternaria de NDK de diferentes organismos, básicamente se reflejan los hexámeros en eucariotas aunque a la vez se presentan como tetrámeros como el caso de NDK de eritrocitos de humano de acuerdo a (Stoeckler *et al.*, 1978).

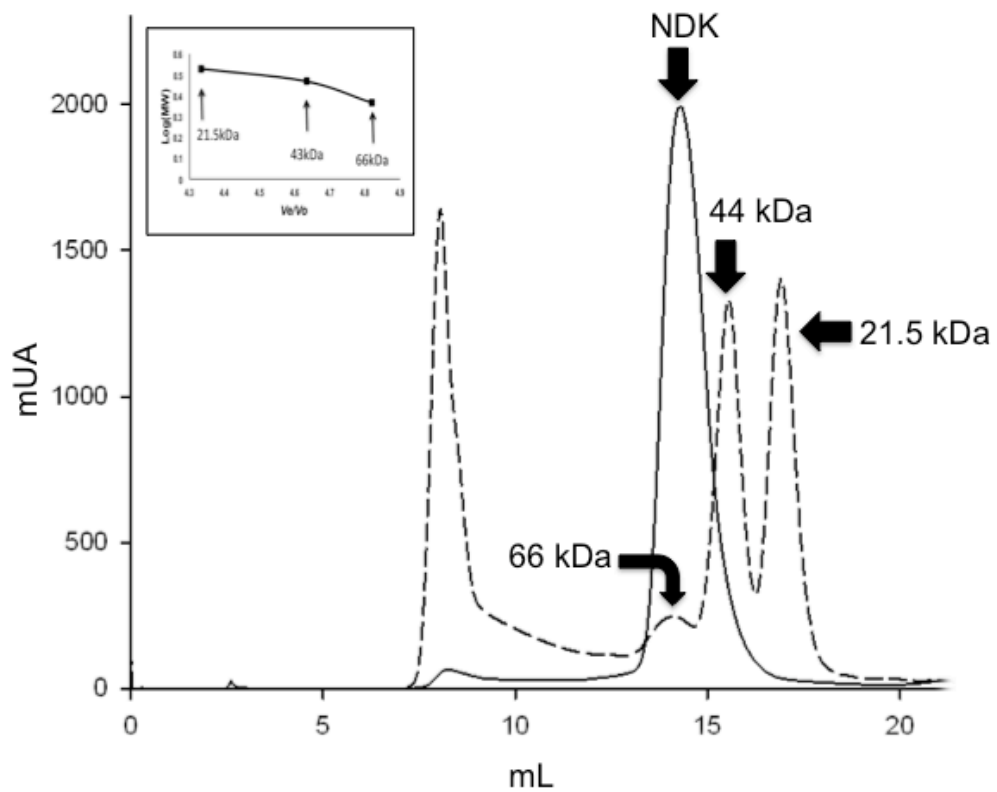


Figura 18.- Cromatograma obtenido a partir de cromatografía de exclusión molecular. El peso molecular nativo de la NDK de *L. vannamei* fue de 66 kDa de acuerdo a la calibración con estándares moleculares, indicando que es un trímero.

La estructura cuaternaria está relacionada con la estabilidad de las enzimas y una de las primeras evidencias se obtuvo al analizar las mutantes en el lazo (*loop*) Kpn de *Drosophila*. La mutación puntual de P97S en NDK generó un fenotipo letal (Timmons & Shearn, 1997). Se observó que la estabilidad de la enzima disminuyó frente a diferentes temperaturas y concentraciones de urea en comparación con la NDK nativa. Al momento de llevar a cabo el replegamiento, la NDK solo generaba monómeros, lo cual indica que la mutación afecta el ensamblado de las subunidades (Lascu *et al.*, 1992). La misma mutación en *Dictyostelium discoideum* mostró una sutil modificación en la interacción entre las subunidades al igual que la NDK de mitocondria de humano, provocando que frente a la desnaturalización con urea, la ausencia de la prolina, que es un residuo conservado, incrementa la estabilidad de la enzima (Milon *et al.*, 2000). Análisis de la mutación P105G en la NDK de *Dictyostelium discoideum* mostró que la estructura cuaternaria era idéntica a la que muestra la estructura nativa con la excepción de la ausencia de la prolina en la cadena lateral, lo cual provocó la disminución del área de interacción entre las áreas no polares de la cadena. Aunque de manera inicial este cambio es pequeño, afecta en gran magnitud a la estabilidad de la enzima (Lascu *et al.*, 1993). La Figura 19 muestra el modelo molecular de la NDK de *L. vannamei* el cual predice que es un trímero de acuerdo a la alta identidad que muestra en alineamiento con su homóloga en humano nm23-H1.

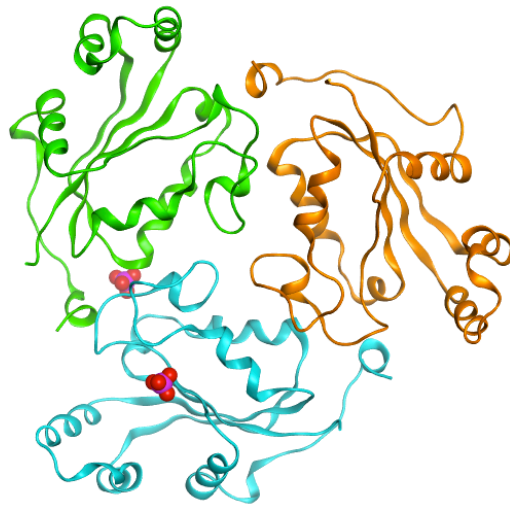


Figura 19.- Modelo estructural de NDK de *L. vannamei* obtenido mediante el paquete computacional MOE versión 2011.10. Se utilizó como templado nm23-H1 PDB 3L7U.

Cada monómero de NDK de *L. vannamei* posee un dominio α/β con dos hélices α a un costado de la hoja β , la cual es estabilizada por interacciones hidrofóbicas. En la Tabla 2 se muestran algunas diferencias de la estructura cuaternaria de NDK de distintos organismos. En organismos como *H. sapiens*, *D. melanogaster*, *M. musculus* por mencionar algunos se encuentra en forma de hexámero (Webb *et al.*, 1995). Pocos organismos presentan una estructura tetramérica como el caso de *E. coli*, y trimérica como *X. laevis*, donde el ensamblado de los monómeros en los diferentes tipos de estructura cuaternaria es idéntico. La asociación de cada monómero influye en la formación de la estructura cuaternaria, es decir, tres dímeros se asocian para generar un hexámero y dos dímeros se asocian por interacción en una región específica de la superficie del dímero contiguo para generar un tetrámero. En el caso de los residuos que forman parte de la interfase (dímero-dímero) involucrados en la formación del hexámero han sido bien conservados durante la evolución.

Tabla 2.- Estructura cuaternaria de NDK en diferentes organismos.

Organismo	Tejido o Recombinante	Estructura Cuaternaria
Humano (MI)	Eritrocitos	Hexámero
<i>Xenopus laevis</i>	-----	Trímero-Tetrámero
<i>Myxococcus xanthus</i>	Recombinante	Trímero
<i>Dictyostelium discoideum</i>	Recombinante	Hexámero
<i>Drosophila melanogaster</i>	-----	Hexámero

Modificado de (Lascu *et al.*, 2000).

Diferentes residuos juegan un papel importante en el ensamblado de las subunidades, en el caso de NDK de *L. vannamei* no se han definido por la estructura cristalográfica como los ejemplos mencionados anteriormente, sin embargo se llevó a cabo una predicción *in silico* de la interacción de los cuatro desoxinucleótidos en el sitio activo de NDK o anclaje con los desoxinucleótidos difosfato (*docking*). De acuerdo al anclaje, la H117 que es el residuo encargado de la transferencia del grupo fosfato es conservado así como S119 y E128 (Figura 20). La presencia de otros residuos como K11 y N114 son importantes en la unión con el OH 3' de la ribosa, en el caso de F59 participa en el posicionamiento del anillo de la base, así como otros aminoácidos básicos que alinean la entrada de los fosfatos. En el modelo se observa que tanto desoxirribonucleótidos de purina y pirimidinas embonan en el sitio activo de la enzima (Janin *et al.*, 2000), pero se ha reportado que la desoxicitidina muestra una pobre afinidad (Kandeel & Kitade, 2010b).

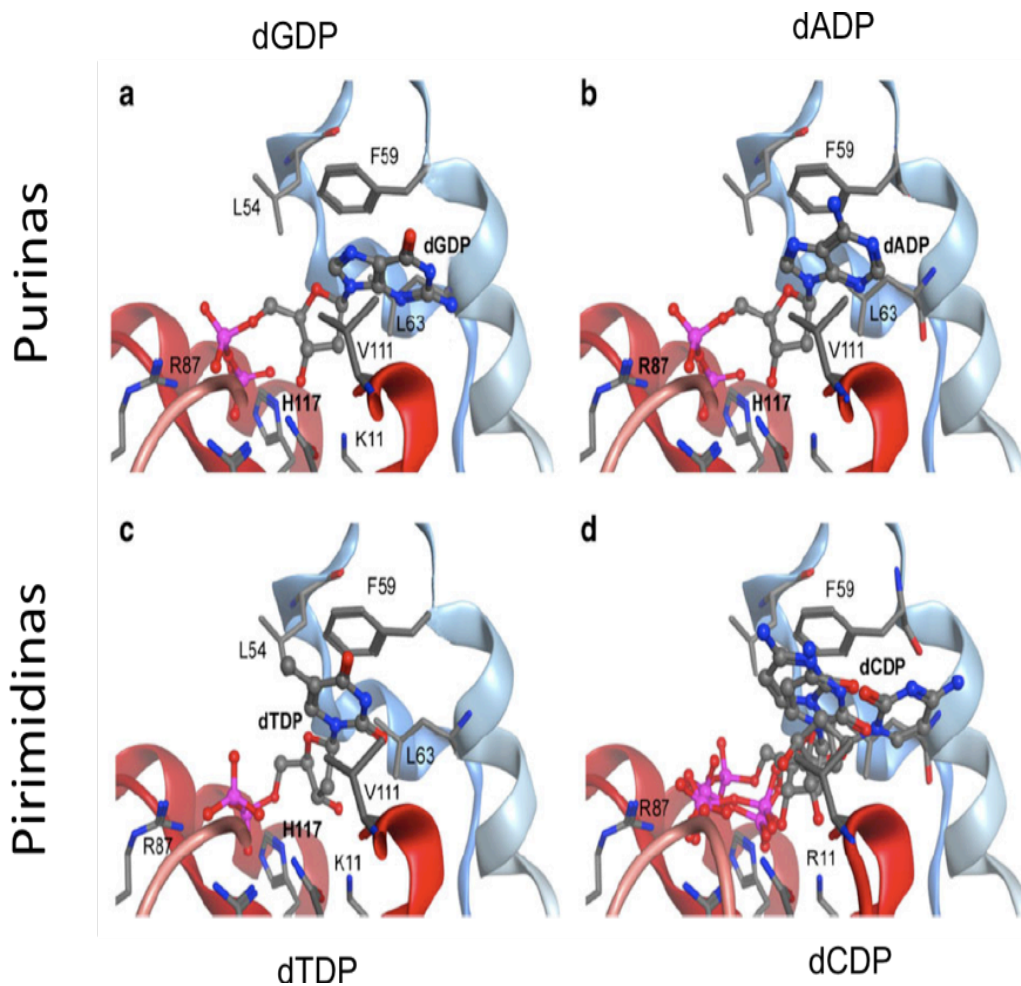


Figura 20.- Modelo teórico del anclaje (*docking*) entre NDK de *L. vannamei* y desoxinucleótidos difosfato. a) Interacción de dGDP y el sitio activo, se observa la interacción favorable entre el anillo de la purina y V111, F59 y L63. b) La interacción con dADP inclusive dTDP (c) se observa la misma interacción aunque L63 no participa en la interacción. d) Se encontraron varios conformeros durante el experimento lo cual es consistente con la falta de interacción en ITC.

Las constantes de afinidad de NDK frente a los nucleótidos, así como los parámetros termodinámicos ΔG , ΔH y ΔS , se determinaron mediante calorimetría de titulación isotérmica (Tabla 3). Dentro de los nucleótidos estudiados dGDP mostró la mayor constante de afinidad ($K_d = 7.6 \mu\text{M}$), mientras que dADP y dTDP muestran valores menores de constante de afinidad, muy similares entre ambos, $K_d = 14.6 \mu\text{M}$ y $13.7 \mu\text{M}$, respectivamente. dCDP no generó calor de interacción, a pesar de haber presentado una actividad enzimática de 9,648 U/mg proteína. Lo anterior puede explicarse si se considera que en este caso la formación del complejo enzima-sustrato es debida exclusivamente a la entropía de la interacción, presentando una entalpía muy cercana a cero, con lo cual el calor liberado o absorbido durante la reacción de complejación no es detectado por el equipo.

Por otra parte, para todos los nucleótidos estudiados a excepción de dCDP la formación de los complejos con NDK presentan entalpías y entropías favorables. En el caso de dGDP la principal contribución a la estabilidad del complejo es del factor entálpico, con un $\Delta H = -4.4 \text{ kcal/mol}$ que a su vez es el mayor valor de entalpía para los nucleótidos estudiados; de estos datos se infiere que dGDP presenta un mayor número de enlaces de hidrógeno en el sitio activo. Los valores del cambio de entalpía para dADP ($\Delta H = -2.7 \text{ kcal/mol}$) y dTDP ($\Delta H = -2.2 \text{ kcal/mol}$) son menores en comparación con dGDP, lo cual indica que, en los respectivos complejos, hay un menor número de enlaces de hidrógeno formados entre el sitio activo de la enzima y el sustrato. Por otra parte, conforme en la serie de nucleótidos estudiados la entalpía se torna menos favorable, la entropía se vuelve mas favorable:

$d\text{GDP}(\Delta S = 2.7 \text{ kcal/mol}) < d\text{ADP}(\Delta S = 4.0 \text{ kcal/mol}) < d\text{TDP}(\Delta S = 4.6 \text{ kcal/mol})$,

fenómeno conocido como compensación entalpía-entropía, en cual conforme uno de los parámetros termodinámicos se vuelve mas favorable, el otro tiende a ser menos favorable. Esto es posible, ya que a mayor número de enlaces formados (entalpía mas favorable) el complejo debe ser mas rígido, con el consecuente costo entrópico; por otra parte, menor número de enlaces implica menos rigidez (o mayor flexibilidad) y por lo tanto menor costo entrópico. En

nuestro caso de estudio, la formación de un mayor número de enlaces de hidrógeno proporciona una mayor estabilidad del complejo enzima sustrato, a pesar del costo entrópico que ello ocasiona, por lo cual NDK presenta una mayor afinidad hacia dGDP.

Tabla 3.- Parámetros termodinámicos y constantes de unión de NDK de *L. vannamei* frente a desoxinucleótidos difosfato obtenidos mediante calorimetría de titulación isotérmica.

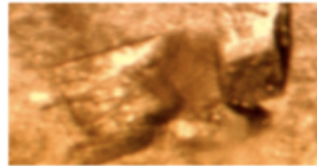
<i>Ligando</i>	ΔH <i>kcal/mol</i>	$T\Delta S$ <i>kcal/mol</i>	ΔG <i>kcal/mol</i>	$K_d(\mu M)$
dGDP	-4.4	2.7	-7.1	7.6
dADP	-2.7	4.0	-6.7	14.6
dTDP	-2.2	4.6	-6.8	13.7
dCDP	sin calor de interacción detectable			

De acuerdo a los datos anteriores, la estabilidad del complejo de NDK con dGDP permitió la generación del análisis de condiciones de cristalización a partir de un total de 190 soluciones de un kit comercial de Hampton Research, Laguna Niguel, USA. Se obtuvieron cristales del complejo binario (NDK-dGDP) en la solución 19 del kit 1 (Crystal screen 1) el cual contiene 0.2 M de acetato de magnesio tetrahidratado, pH 6.5 y PEG 8000 al 20% (Figura 21). Los resultados de la difracción de dichos cristales generarán información básica e importante sobre las bases moleculares de la interacción NDK-dGDP, lo cual será clave para la generación de un fármaco dirigido a WSSV.

Largo: 0.7 mm
Ancho: 0.4 mm



a)



b)

Figura 21.- a) Cristales obtenidos a los 30 días en 0.2 M de acetato de magnesio tetrahidratado, pH 6.5 y PEG 8000 al 20%, (NDK-dGDP). b) Cristal roto utilizando un cabello de cola de caballo, lo cual indica que el cristal es de proteína y no de sal. Ambos corresponden a el complejo binario NDK dGDP.

CONCLUSIONES

Se obtuvo la enzima nucleósido difosfato cinasa (NDK) de *L. vannamei* de forma soluble a partir de un gen sintético, el cual fue construido a partir de la secuencia depositada de la misma en el banco de genes con la clave de acceso DQ907945.1. Lo anterior fue corroborado de acuerdo al análisis electroforético de la cinética de sobreexpresión al comparar la muestra antes y posterior a la inducción.

Se purificó la enzima nucleósido difosfato cinasa (NDK) de *L. vannamei* mediante cromatografía de afinidad a metales (IMAC). Se obtuvo un rendimiento protéico de 10 mg/mL a partir de un litro de cultivo.

En base a los resultados arrojadas del análisis *in silico*, donde se utilizó como templado nm23-H1 (PDB 3L7U), se identificó a la enzima nucleósido difosfato cinasa (NDK) de *L. vannamei* como un trímero; lo cual fue consistente con los resultados obtenidos mediante cromatografía de filtración en gel.

Los resultados del anclaje (*docking*) permitieron hacer la simulación de la interacción de los desoxinucleótidos difosfato (dADP, dCDP, dTDP y dGDP) con el sitio activo de nucleósido difosfato cinasa (NDK) de *L. vannamei* y se definieron los residuos que intervienen en la catálisis. Además se observó que dCDP, de acuerdo al refinamiento, el comportamiento del anclaje no fue consistente con los desoxinucleótidos difosfato restantes.

Los parámetros termodinámicos de nucleósido difosfato cinasa (NDK) de *L. vannamei* frente a los desoxinucleótidos difosfato (dADP, dCDP, dTDP y

dGDP) definen que la interacción de NDK con dGDP presenta la mayor constante de afinidad con respecto a los desoxinucleótidos difosfato restantes. dADP muestra una constante de disociación comparable con dGDP aunque la unión del complejo es guiado por la entropía. dCDP no muestra calor de interacción por lo que pudiera deberse a un valor bajo en la entalpía, que no es detectado, definiendo que la interacción es guiada por la entropía. Lo anterior es consistente con los resultados de anclaje (*docking*).

REFERENCIAS

- Aktary, Z., Chapman, K., Lam, L., Lo, A., Ji, C., Graham, K., Cook, L., Li, L., Mackey, J. & Pasdar, M. (2010). *Oncogene* 29, 2118-2129.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., BRAY, D. & WATSON, J. (2010). *Classic textbook now in its 5th Edition*.
- Berg, P. & Joklik, W. (1953). *Nature* 172, 1008-1009.
- Bilitou, A., Watson, J., Gartner, A. & Ohnuma, S. (2009). *Molecular and cellular biochemistry* 329, 17-33.
- Cheng, Y. C., Robison, B. & Parks Jr, R. (1973). *Biochemistry* 12, 5-11.
- Chiadmi, M., Morera, S., Lascu, I., Dumas, C., Bras, G. L., Veron, M. & Janin, J. (1993). *Structure* 1, 283-293.
- Clavero-Salas, A., Sotelo-Mundo, R. R., Gollas-Galván, T., Hernández-López, J., Peregrino-Uriarte, A. B., Muhlia-Almazán, A. & Yepiz-Plascencia, G. (2007). *Fish & shellfish immunology* 23, 459-472.
- De Clercq, E. (2001). *Journal of Pharmacology and experimental Therapeutics* 297, 1-10.
- De Clercq, E. (2002). *Nature Reviews Drug Discovery* 1, 13-25.
- De Clercq, E. (2009). *Med Res Rev* 29, 611-645.
- De Clercq, E. & Holy, A. (2005). *Nature Reviews Drug Discovery* 4, 928-940.
- Deville-Bonne, D., El Amri, C., Meyer, P., YUXING, C., Agrofoglio, L. A. & Janin, J. (2010). *Antiviral research* 86, 101-120.
- Durand, S., Lightner, D., Redman, R. & Bonami, J. R. (1997). *Diseases of Aquatic Organisms* 29, 205-211.
- Elion, G. B. (1983). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 12, 9.
- Escobedo-Bonilla, C. M., Alday-Sanz, V., Wille, M., Sorgeloos, P., Pensaert, M. B. & Nauwynck, H. J. (2008). *Journal of Fish Diseases* 31, 1-18.
- Garces, E. & Cleland, W. W. (1969). *Biochemistry* 8, 633-640.

- Gilles, A. M., Presecan, E., Vonica, A. & Lascu, I. (1991). *Journal of Biological Chemistry* 266, 8784-8789.
- Giraud, M. F., Georgescauld, F., Lascu, I. & Dautant, A. (2006). *Journal of bioenergetics and biomembranes* 38, 261-264.
- Herbert, E., Potter, V. R. & Takagi, Y. (1955). *Journal of Biological Chemistry* 213, 923-940.
- Jacobus, W. & Evans, J. (1977). *Journal of Biological Chemistry* 252, 4232-4241.
- Janin, J., Dumas, C., Moreira, S., Xu, Y., Meyer, P., Chiadmi, M. & Cherfils, J. (2000). *Journal of bioenergetics and biomembranes* 32, 215-225.
- Jeudy, S., Claverie, J. M. & Abergel, C. (2006). *Journal of bioenergetics and biomembranes* 38, 247-254.
- Johansson, M., MacKenzie-Hose, A., Andersson, I. & Knorpp, C. (2004). *Plant physiology* 136, 3034-3042.
- Kandeel, M. & Kitade, Y. (2010a). *Journal of bioenergetics and biomembranes* 1-9.
- Kandeel, M. & Kitade, Y. (2010b). *Journal of bioenergetics and biomembranes* 42, 361-369.
- Kimura, N. & Shimada, N. (1988). *Journal of Biological Chemistry* 263, 4647-4653.
- Krebs, H. & Hems, R. (1953). *Biochimica et biophysica acta* 12, 172.
- La Scola, B., Audic, S., Robert, C., Jungang, L., de Lamballerie, X., Drancourt, M., Birtles, R., Claverie, J. M. & Raoult, D. (2003). *Science* 299, 2033-2033.
- Lacombe, M. L. L., Munier, A., Mehus, J. G. & Lambeth, D. O. (2000). *Journal of bioenergetics and biomembranes* 32, 247-258.
- Lascu, I., Chaffotte, A., Limbourg-Bouchon, B. & Veron, M. (1992). *Journal of Biological Chemistry* 267, 12775-12781.
- Lascu, I., Deville-Bonne, D., Glaser, P. & Veron, M. (1993). *Journal of Biological Chemistry* 268, 20268-20275.

- Lascu, I., Giartosio, A., Ransac, S. & Erent, M. (2000). *Journal of bioenergetics and biomembranes* 32, 227-236.
- Lehninger Albert, L. B. (1981). *Replicación y transcripción del DNA*. Segunda edición. Ed. Revolucionaria 903-930.
- Leu, J. H., Yang, F., Zhang, X., Xu, X., Kou, G. H. & Lo, C. F. (2009). *Lesser Known Large dsDNA Viruses* 197-227.
- Lightner, D. V. (1996). *A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp*. World Aquaculture Society.
- Mathews, C. K., Ahern, K. G. & Van Holde, K. E. (2002). *Biochemistry*, Cuarta edición ed. Pearson Education Limited.
- Matte, A., Tari, L. W. & Delbaere, L. T. J. (1998). *Structure* 6, 413-419.
- Mayo, M. (2002a). *Archives of virology* 147, 1655-1656.
- Mayo, M. (2002b). *Archives of virology* 147, 1071-1076.
- Mehus, J. G., Deloukas, P. & Lambeth, D. O. (1999). *Human genetics* 104, 454-459.
- Mesnildrey, S., Agou, F., Karlsson, A., Bonne, D. D. & Veron, M. (1998). *Journal of Biological Chemistry* 273, 4436.
- Milon, L., Meyer, P., Chiadmi, M., Munier, A., Johansson, M., Karlsson, A., Lascu, I., Capeau, J., Janin, J. & Lacombe, M. L. (2000). *Journal of Biological Chemistry* 275, 14264-14272.
- Milon, L., Rousseau-Merck, M. F., Munier, A., Erent, M., Lascu, I., Capeau, J. & Lacombe, M. L. (1997). *Human genetics* 99, 550-557.
- Moréra, S., Lacombe, M. L., Yingwu, X. & Joel Janin, G. L. B. (1995). *Structure* 3, 1307-1314.
- Morera, S., LeBras, G., Lascu, I., Lacombe, M., Veron, M. & Janin, J. (1994). *Journal of molecular biology* 243, 873-890.
- Munch-Petersen, B., Cloos, L., Tyrsted, G. & Eriksson, S. (1991). *Journal of Biological Chemistry* 266, 9032-9038.
- Namikoshi, A., Wu, J. L., Yamashita, T., Nishizawa, T., Nishioka, T., Arimoto, M. & Muroga, K. (2004). *Aquaculture* 229, 25-35.

- Perozzo, R., Jelesarov, I., Bosshard, H. R., Folkers, G. & Scapozza, L. (2000). *Journal of Biological Chemistry* 275, 16139-16145.
- Postel, E., Berberich, S., Flint, S. & Ferrone, C. (1993). *Science (New York, NY)* 261, 478.
- Postel, E. H., Abramczyk, B. A., Gursky, S. K. & Xu, Y. (2002). *Biochemistry* 41, 6330-6337.
- Quintero-Reyes, I. E., Garcia-Orozco, K. D., Sugich-Miranda, R., Arvizu-Flores, A. A., Velazquez-Contreras, E. F., Castillo-Yañez, F. J. & Sotelo-Mundo, R. R. (2012). *Journal of bioenergetics and biomembranes* 1-7.
- Rajesh Kumar, S., Ishaq Ahamed, V., Sarathi, M., Nazeer Basha, A. & Sahul Hameed, A. (2008). *Fish & shellfish immunology* 24, 467-478.
- Rameshthangam, P. & Ramasamy, P. (2007). *Virus research* 126, 38-44.
- Sánchez-Paz, A. (2010). *Veterinary research* 41.
- Steeg, P. S., Bevilacqua, G., Kopper, L., Thorgeirsson, U. P., Talmadge, J. E., Liotta, L. A. & Sobel, M. E. (1988). *Journal of the National Cancer Institute* 80, 200-204.
- Stoeckler, J. D., Agarwal, R. P., Agarwal, K. C., Schmid, K. & Parks Jr, R. E. (1978). *Biochemistry* 17, 278-283.
- Timmons, L. & Shearn, A. (1997). *Advances in Genetics* 35, 207-252.
- Tsai, J. M., Wang, H. C., Leu, J. H., Hsiao, H. H., Wang, A. H. J., Kou, G. H. & Lo, C. F. (2004). *Journal of virology* 78, 11360-11370.
- Tsuiki, H., Nitta, M., Furuya, A., Hanai, N., Fujiwara, T., Inagaki, M., Kochi, M., Ushio, Y., Saya, H. & Nakamura, H. (2000). *Journal of cellular biochemistry* 76, 254-269.
- van Hulten, M. C. W., Witteveldt, J., Peters, S., Kloosterboer, N., Tarchini, R., Fiers, M., Sandbrink, H., Lankhorst, R. K. & Vlak, J. M. (2001). *Virology* 286, 7-22.
- Veer Reddy, G. P. & Pardee, A. B. (1980). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 77, 3312-3316.
- Venegas, C., Nonaka, L., Mushiake, K., Nishizawa, T. & Muroga, K. (2000). *Diseases of Aquatic Organisms* 42, 83-89.

- Webb, P. A., Perisic, O., Mendola, C. E., Backer, J. M. & Williams, R. L. (1995). *Journal of molecular biology* 251, 574-587.
- Williams, R. L., Oren, D. A., Muñoz-Dorado, J., Inouye, S., Inouye, M. & Arnold, E. (1993). *Journal of molecular biology* 234, 1230-1247.
- Wu, J., Nishioka, T., Mori, K., Nishizawa, T. & Muroga, K. (2002). *Fish & shellfish immunology* 13, 391-403.
- Yelick, P. C., Kwon, Y. K., Flynn, J. F., Borzorgzadeh, A., Kleene, K. C. & Hecht, N. B. (1989). *Molecular reproduction and development* 1, 193-200.
- Yi, G., Wang, Z., Qi, Y., Yao, L., Qian, J. & Hu, L. (2004). *Journal of biochemistry and molecular biology* 37, 726.

ANEXO I

ANEXO II