

La carbamil fosfato sintetasa 1 (CPS1), una enzima mitocondrial de 1462 residuos, cataliza la entrada del amonio en el ciclo de la urea, que convierte esta neurotoxina derivada del catabolismo de las proteínas en urea, que es mucho menos tóxica. El déficit de CPS1 (CPS1D) es un error innato del ciclo de la urea, una enfermedad rara con herencia mendeliana autosómica recesiva, que se debe a mutaciones en el gen *CPS1* (>200 mutaciones descritas) y que cursa con hiperamonemia.

Hemos producido CPS1 humana recombinante (hCPS1) en un sistema de expresión de células de insecto y baculovirus, y la hemos aislado en forma activa y muy pura y en cantidad elevada. Ello ha permitido la cristalización de la enzima para estudios estructurales de difracción de rayos-X (un trabajo derivado de esta tesis pero no incluido en ella). Este sistema de producción de hCPS1 permite la realización de mutagénesis dirigida y la caracterización de la enzima como catalizador (actividad, cinética) y como proteína (estabilidad, estado de agregación y composición de dominios). Hemos revelado características de la hCPS1 antes no exploradas como es la composición de dominios, la capacidad que tiene el glicerol para reemplazar al activador natural y esencial de la CPS1, N-acetil-L-glutamato (NAG), y la protección de la hCPS1 por NAG y por su análogo farmacológico N-carbamil-L-glutamato (NCG) (chaperonas químicas).

Hemos utilizado este sistema para explorar los efectos en la actividad, los parámetros cinéticos y la estabilidad/plegamiento de la enzima, y para comprobar la naturaleza patogénica de mutaciones identificadas en pacientes con CPS1D. Estos resultados, junto con los obtenidos con otras mutaciones no clínicas, han aportado información novedosa sobre tres de los dominios no catalíticos de la CPS1.

Las observaciones realizadas tras introducir en el dominio de tipo glutaminasa de la enzima tres mutaciones asociadas a CPS1D y un polimorfismo trivial, apoyan la contribución de este dominio no catalítico a la estabilidad y a aumentar la actividad de la enzima. Dos mutaciones introducidas en el dominio de fosforilación de bicarbonato han arrojado algo de luz sobre el modo de unión del bicarbonato (un sustrato). Los resultados de estas mutaciones también han confirmado la contribución de este dominio para la unión de NAG, cuyo sitio de unión se encuentra en el dominio C-terminal de CPS1, bastante alejado (en la secuencia) del dominio de fosforilación de bicarbonato. Además, hemos introducido 18 mutaciones de cambio de sentido asociadas a CPS1D, las cuales están localizadas en un dominio no catalítico, central y de elevada elocuencia clínica. Estos resultados han demostrado la naturaleza patogénica de estas mutaciones, ya que en la mayoría de los casos estas mutaciones producen un mal plegamiento o/y desestabilización de la enzima. Debido a que estos resultados han puesto de manifiesto el importante papel de este dominio en la integración estructural de la proteína multidominio CPS1, lo hemos llamado Dominio Integrador.

Finalmente, hemos examinado los efectos de ocho mutaciones asociadas a CPS1D, de un polimorfismo trivial y de cinco mutaciones no clínicas, todas ellas localizadas en el dominio C-terminal de la enzima, donde se une NAG. Además, hemos reanalizado resultados anteriores con otras seis mutaciones clínicas y cuatro no clínicas afectando a este dominio. Hemos confirmado el carácter patogénico de las mutaciones clínicas, las cuales predominantemente causan una disminución en la actividad enzimática, en muchos casos debida a que la unión de NAG se encuentra obstaculizada. Unas pocas mutaciones mostraron efectos negativos sustanciales en la estabilidad/plegamiento de la CPS1. Nuestros análisis revelan que la activación por el NAG empieza con un movimiento de la parte final del bucle $\beta 4-\alpha 4$ del sitio de

NAG. La transmisión de la señal activadora a los dominios de fosforilación implica a la hélice $\alpha 4$ de este dominio y posiblemente se transmite a través de los bucles homólogos 1338-1332 y 778-787 (numeración de los residuos) pertenecientes, respectivamente, a los dominios de fosforilación de carbamato y bicarbonato. Por ello, hemos llamado a ambos bucles homólogos Bucles de Transmisión de la Señal.