

**UNIDAD DE GENÉTICA CLÍNICA Y GENÓMICA FUNCIONAL
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y FISIOLOGÍA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**



TRABAJO FIN DE GRADO

**Mutagénesis dirigida y
ensayo enzimático de la mutación R501P
en el gen *HMGCS2***

**Site-directed mutagenesis and
enzymatic assay of R501P mutation
in *HMGCS2* gene**

**Memoria presentada por: Sergio Gil Clavero
Director: Juan Pié Juste**

Junio de 2017

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Metabolismo de los cuerpos cetónicos	3
1.1.1 Regulación de la cetogénesis	5
1.2 Enzima HMG-CoA sintasa mitocondrial humana	5
1.2.1 Gen <i>HMGCS2</i>	6
1.2.2 Estructura de la enzima	6
1.2.3 Modelo bioinformático en 3D	8
1.3 Deficiencia de HMG-CoA sintasa mitocondrial humana	8
1.3.1 Manifestaciones clínicas y exploración física	8
1.3.2 Diagnóstico diferencial	9
1.3.3 Pronóstico y tratamiento	10
1.4 Diagnóstico de la deficiencia de mHS	10
1.4.1 Diagnóstico bioquímico	10
1.4.2 Diagnóstico anatomopatológico	11
1.4.3 Estudio molecular del gen <i>HMGCS2</i>	11
1.4.4 Actividad enzimática	11
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIAL Y MÉTODOS	14
3.1 MATERIAL	14
3.1.1 Datos clínicos del paciente	14
3.1.2 Gen <i>HMGCS2</i> y vector pMAL-c2X	14
3.2 MÉTODOS	15
3.2.1 Mutagénesis dirigida	15
3.2.1.1 PCR de la mutagénesis	16
3.2.1.2 Digestión enzimática	16
3.2.1.3 Transformación de XL1-Blue	17
3.2.1.4 Selección de colonias positivas	17
3.2.1.5 Transformación de BL21	18

3.2.2 Expresión de mutantes y obtención proteica	19
3.2.2.1 Inducción de la expresión	19
3.2.2.2 Lisis celular	19
3.2.2.3 Purificación y corte de la proteína de fusión	19
3.2.3 Cuantificación proteica	19
3.2.3.1 Método Bradford	19
3.2.3.2 Western Blot	20
3.2.4 Ensayo de la actividad enzimática	21
3.2.4.1 Cálculo del coeficiente de extinción molar	22
3.2.4.2 Cálculo de la actividad enzimática	23
3.2.5 Predicción bioinformática	23
4. RESULTADOS	24
4.1 Estudio funcional “in vitro”	24
4.1.1 Mutagénesis dirigida	24
4.1.2 Método Bradford	25
4.1.3 Western-Blot	26
4.1.4 Ensayo de la actividad enzimática	27
4.2 Predicción bioinformática	28
4.2.1 Variantes alélicas R501P y R501Q	28
5. DISCUSIÓN	29
5.1 Estudio funcional “in vitro”	29
5.2 Localización y efecto de las variantes	29
5.3 Ventajas y limitaciones del estudio	30
6. CONCLUSIONES	31
7. BIBLIOGRAFÍA	32
ANEXOS	35
Anexo 1 Pacientes con deficiencia de mHS descritos en todo el mundo	36
Anexo 2 Protocolos utilizados	39
Anexo 3 Abreviaturas	46
Anexo 4 Lista de aminoácidos	48

RESUMEN

Introducción: la deficiencia de HMG-CoA sintasa mitocondrial humana es un error congénito del metabolismo que muestra un patrón de herencia autosómico recesivo. Tiene muy baja prevalencia. Está producida por mutaciones en homocigosis o heterocigosis compuesta del gen *HMGCS2*. Fue descrita por primera vez en 1997. La enzima mHS tiene un rol importante en la cetogénesis, ya que es la encargada de catalizar la condensación del acetil-CoA y el acetoacetil-CoA para formar HMG-CoA en las mitocondrias de los hepatocitos. Su clínica es muy inespecífica y se caracteriza por crisis agudas de hipoglucemia con hipocetonemia. Los síntomas más frecuentes son náuseas, vómitos, irritabilidad y letargia. Sin tratamiento, puede progresar a encefalopatía, coma y muerte. **Material y métodos:** en este trabajo se ha utilizado un método de mutagénesis dirigida y ensayo enzimático “in vitro” para medir la actividad de la variante alélica R501P, reportada por primera vez. Para llevarlo a cabo, se han empleado células de *Escherichia coli* usando el vector de expresión pMAL-c2X-mHS. Posteriormente, el efecto de cada mutación en la estructura de la proteína ha sido analizado con un modelo bioinformático en 3D. Además, se ha comparado su actividad con la de la proteína wild-type (WT) y con la variante R501Q, previamente reportada y de localización análoga en la proteína. **Resultados:** todas las proteínas recombinantes se han conseguido obtener solubles en disolución. La proteína WT ha alcanzado una concentración de 0,298µg/µl y una actividad enzimática de 0,910 U/mg, mientras que las variantes R501P y R501Q han presentado una concentración de 0,241µg/µl y 0,304µg/µl respectivamente y una ausencia total de actividad. Las predicciones bioinformáticas se correlacionan con estos resultados: el efecto producido en ambas mutaciones es la distorsión de una zona de la proteína próxima a la superficie de dimerización, impidiendo así su actividad catalítica. **Discusión:** por tercera vez se ha comprobado la buena reproductibilidad del método de expresión, purificación y ensayo enzimático de la enzima mHS humana. Debido a la inespecificidad del diagnóstico clínico y bioquímico, el estudio molecular y la caracterización funcional de las mutaciones “in vitro” emerge como el método de elección para el diagnóstico de certeza de estos pacientes.

Palabras clave: cuerpos cetónicos, cetogénesis, HMG-CoA, deficiencia HMG-CoA sintasa mitocondrial, *HMGCS2*.

ABSTRACT

Introduction: the human mitochondrial HMG-CoA synthase deficiency is an inborn error of metabolism that shows an autosomal recessive inheritance pattern. It has a very low prevalence. It is caused by mutations in homozygosis or compound heterozygosis of the *HMGCS2* gene. It was first described in 1997. The mHS enzyme plays an important role in the ketogenesis, since it is responsible for catalysing the condensation of acetyl-CoA and acetoacetyl-CoA to form HMG-CoA in the mitochondria of the hepatocytes. Its clinical manifestations are very non-specific and it is characterized by acute hypoglycemic crises with hypoketoneuria. The most frequent symptoms are nausea and vomiting, irritability and lethargy. Without treatment, it can progress to encephalopathy, coma and death. **Material and methods:** in this work, we have used a method of site-directed mutagenesis and enzymatic assay "in vitro" to measure the activity of the allelic variant R501P, reported for the first time. To carry it out, *Escherichia coli* cells have been used using the expression vector pMAL-c2X-mHS. Subsequently, the effect of each mutation on protein structure was analyzed with a 3D bioinformatic model. In addition, its activity has been compared with the wild-type protein (WT) and with the R501Q variant previously reported, and with analogous location in the protein. **Results:** all recombinant proteins have been obtained soluble in solution. The WT protein has reached a concentration of 0.298µg/µl and an enzymatic activity of 0.910 U/mg, whereas the R501P and R501Q variants, have obtained a concentration of 0.241µg/µl and 0.304µg/µl respectively, and a totally lack of activity. The bioinformatic predictions correlate with these results: the effect produced is the distortion of a zone of the protein close to the surface of dimerization, avoiding its catalytic activity. **Discussion:** good reproducibility of the method of expression, purification and enzymatic assay of the human mHS enzyme has been demonstrated for the third time. Due to the lack of specificity of clinical and biochemical diagnosis, the molecular study and functional characterization of "in vitro" mutations emerge as the method of choice for the certainty diagnosis of these patients.

Keywords: ketone bodies, ketogenesis, HMG-CoA, mitochondrial HMG-CoA synthase deficiency, *HMGCS2*.

INTRODUCCIÓN

1.1 METABOLISMO DE LOS CUERPOS CETÓNICOS

La cetogénesis es un proceso metabólico cuya finalidad es la formación de los cuerpos cetónicos acetona, acetoacetato y β -hidroxibutirato a partir del acetil-CoA producido en la β -oxidación de los ácidos grasos [1]. Tiene lugar principalmente en el interior de las mitocondrias de los hepatocitos y, en menor medida, en riñones, astrocitos y enterocitos [2].

Los cuerpos cetónicos sirven como fuente alternativa de combustible para las células en aquellas situaciones en las que existe un insuficiente aporte de glucosa en relación a las demandas, como ocurre en el ayuno, el ejercicio intenso o el embarazo, o aquellas situaciones donde su utilización es inadecuada, como en la diabetes mellitus [3].

En el ayuno, la hipoglucemia disminuye los valores de insulina circulantes y estimula un incremento de las hormonas contrainsulares: glucagón, hormona del crecimiento (GH), noradrenalina, cortisol... Esto produce un menor consumo de glucosa en el músculo, el tejido adiposo y el hígado, pero no en el cerebro, cuyo aporte de glucosa es a través de los transportadores no insulino-dependientes GLUT-1 y GLUT-3. A partir de las 12 horas de ayuno, tras agotar las reservas de glucógeno hepático, se pone en marcha la lipólisis. Los triglicéridos se escinden en glicerol y ácidos grasos libres, liberándose grandes cantidades al torrente sanguíneo [4].

A partir de este momento, toda la glucosa aportada a la circulación va a provenir de la gluconeogénesis, que tiene lugar en el hígado y en los riñones. Este proceso metabólico va a consumir los intermediarios del ciclo del ácido cítrico [3]. En la mitocondria, el acetil-CoA, al no poder entrar en el ciclo, deriva hacia la formación de cuerpos cetónicos [4]. En ayunos prolongados, más de las 2/3 partes de los requerimientos energéticos del cerebro provienen del metabolismo de los cuerpos cetónicos [5].

Durante el embarazo, se producen numerosas adaptaciones metabólicas en la madre con el fin de asegurar un adecuado suministro de metabolitos para el crecimiento y desarrollo del feto. Entre ellos se encuentran los cuerpos cetónicos que, además de ser empleados como combustible, sirven como sustrato para la síntesis de lípidos cerebrales. No obstante, periodos prolongados de hipercetonemia en la madre se han asociado a una mayor incidencia de malformaciones fetales y deterioro del desarrollo neurofisiológico [6].

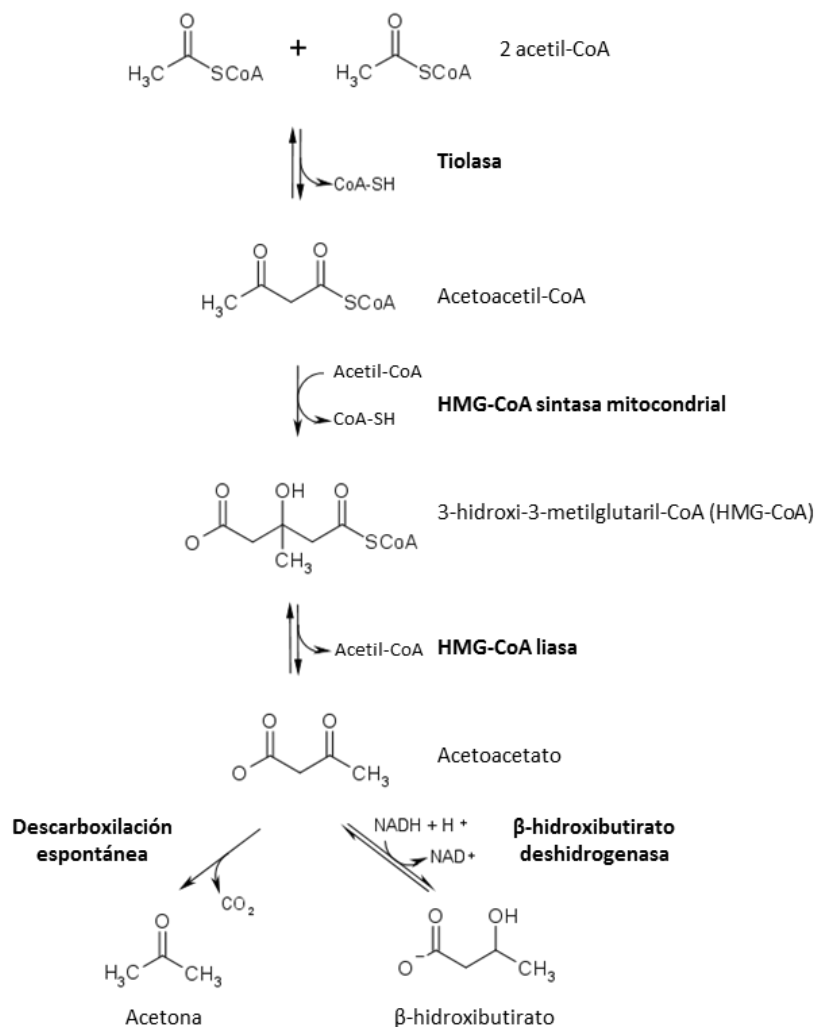


Figura 1.1 Ruta principal de la cetogénesis

La cetogénesis se realiza en cuatro pasos [3] (ver figura 1.1):

1. Dos moléculas de acetil-CoA se condensan para formar acetoacetyl-CoA. Reacción catalizada por la enzima acetoacetyl-CoA tiolasa (EC 2.3.1.9).
2. El acetoacetyl-CoA se une con una molécula de acetil-CoA para formar 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Reacción catalizada por la enzima HMG-CoA sintasa mitocondrial (mHS) (EC 2.3.3.10).
3. El HMG-CoA se escinde formando acetil-CoA y acetoacetato. Reacción catalizada por la enzima HMG-CoA liasa (HL) (EC 4.1.3.4).
4. El acetoacetato formado es reducido reversiblemente a β-hidroxibutirato por la enzima β-hidroxibutirato deshidrogenasa (EC 1.1.1.30). La acetona se forma espontáneamente a partir de la descarboxilación del acetoacetato o por acción de la enzima acetoacetato descarboxilasa (EC 4.1.1.4).

Existe una ruta secundaria de síntesis de cuerpos cetónicos en la que se producen por degradación de la leucina. Una vez sintetizados, el acetoacetato y el β-hidroxibutirato son

transportados a los tejidos extrahepáticos, donde se convierten en acetil-CoA, que se oxida a través del ciclo del ácido cítrico para producir energía [3].

En estos procesos interviene la enzima β -cetoacil-CoA transferasa o tioforasa (EC 2.8.3.5), que transfiere el CoA del succinil-CoA al acetoacetato, formando acetoacetil-CoA. El hígado carece de dicha enzima, por lo tanto, es un órgano productor de cuerpos cetónicos pero no consumidor. El β -hidroxibutirato es el cuerpo cetónico más abundante en sangre [2].

En el caso de la diabetes mellitus no tratada, la síntesis excesiva de cuerpos cetónicos supera la capacidad oxidativa de los tejidos extrahepáticos. Los niveles sanguíneos de acetoacetato y β -hidroxibutirato aumentan, disminuyendo de este modo el pH. Dicha situación, conocida como cetoacidosis, puede conducir al coma o a la muerte [7].

Dentro de las alteraciones del metabolismo de los cuerpos cetónicos vamos a encontrar tanto defectos a nivel de la cetogénesis: deficiencia de mHS y deficiencia de HL; como a nivel de la cetolisis: deficiencia de succinil-CoA acetoacetato transferasa (SCOT) y deficiencia de β -cetotilasa [1].

1.1.1 Regulación de la cetogénesis

La cetogénesis está regulada mediante diversos mecanismos. A nivel enzimático, por dos enzimas principales: la carnitina palmitotransferasa I (CPT1) (EC 2.3.1.2) y la mHS [8]. La CPT1 se encarga de la entrada del acil-CoA a la mitocondria, regulando la cetogénesis a nivel de sustrato [9].

A nivel hormonal, el glucagón, el cortisol, la GH, las catecolaminas y las hormonas tiroideas estimulan la lipólisis y la movilización de ácidos grasos libres al torrente sanguíneo y, de este modo, la síntesis de cuerpos cetónicos [2]. Por el contrario, en presencia de insulina la cetogénesis se inhibe. El ayuno, la fiebre y los vómitos inducen tanto la oxidación de ácidos grasos como la cetogénesis [1].

1.2 ENZIMA HMG-COA SINTASA MITOCONDRIAL

Como se ha comentado previamente, la enzima mHS tiene un rol importante en la síntesis de cuerpos cetónicos, ya que es la encargada de catalizar la condensación del acetil-CoA y el acetoacetil-CoA para formar HMG-CoA [3]. Dicha enzima pertenece a una familia de enzimas denominadas acil-condensasas. Niveles bajos de esta enzima también han sido hallados en linfocitos, intestino, riñones, testes y ovarios [8].

Dicha reacción, con un mecanismo enzimático de tipo Bi Bi Ping Pong, consta de 3 pasos: acilación, condensación e hidrólisis (ver figura 1.2). En el primer paso, el aminoácido histidina (His^{301}) da protones al nucleófilo cisteína (Cys^{166}), que ataca al grupo carbonilo del acetil-CoA, transfiriendo así un grupo acetilo a la enzima y liberando el CoA producido. En el segundo paso, el grupo metilo de la enzima es desprotonado por el glutamato (Glu^{132}) para formar un carbanión que ataca al acetoacetil-CoA. En el tercer paso, el complejo enzima:HMG-CoA resultante es hidrolizado para liberar el HMG-CoA [10].

Por otro lado, existe una isoforma de localización citosólica (cHS), que cataliza la misma reacción pero a nivel de la ruta del mevalonato, un importante metabolito intermediario en la biosíntesis de colesterol [11]. Está codificada por el gen *HMGCS1* (MIM*142940), localizado en el brazo corto del cromosoma 5 (5p12). La secuencia de la enzima cHS presenta una homología del 66% con respecto a la enzima mHS [12].

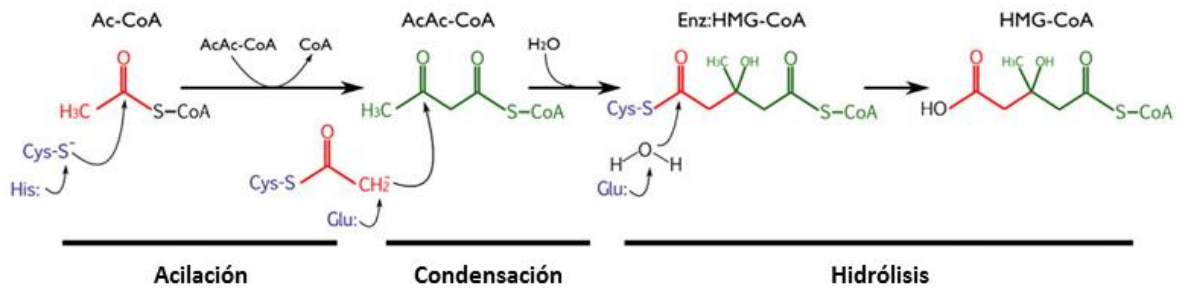


Figura 1.2 Reacción catalizada por la mHS. Modificado de [10]
 Abreviaturas: Ac-CoA: acetil-CoA; AcAc-CoA: acetoacetyl-CoA; Enz: enzima

1.2.1 Gen *HMGCS2*

La enzima mHS está codificada por el gen *HMGCS2* (MIM*600234), localizado en el brazo corto del cromosoma 1 (1p13-12) [13]. Dicho gen está formado por 10 exones y 9 intrones y posee una longitud total de 21708pb (NM_005518.3). La longitud del cDNA es de 2082pb (NP_005509.1) y da lugar a una proteína de 508 aminoácidos. Hasta la fecha se han reportado 34 mutaciones en el gen *HMGCS2*: 28 de tipo *missense*, 4 de tipo *nonsense*, 1 deleción de un exón y 1 intrónica de *splicing*. La mayoría de estas mutaciones se localizan en el exón 2 (ver tabla 1.1).

1.2.2 Estructura de la enzima

La enzima mHS es un monómero que consta de dos partes: el dominio superior es común a toda la familia de acil-condensasas y tiene función tiasa; está constituido por una estructura central formada por 5 capas $\alpha\beta\alpha\beta$. El dominio inferior, propio de las enzimas HMGCS, está formado por varias hélices α y láminas β . La zona entre ambos dominios forma un túnel que corresponde al sitio activo de la enzima, que mide aproximadamente unos 15 Å (ver figura 1.3).

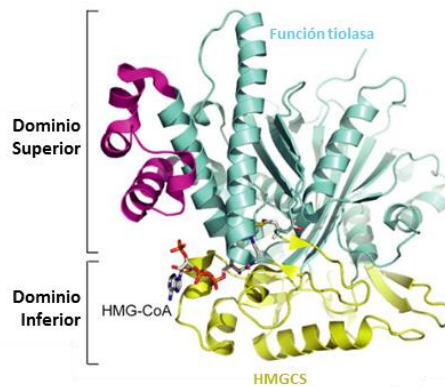


Figura 1.3 Estructura tridimensional de la enzima mHS
 Modificado de [10]

No obstante, para que la enzima tenga actividad catalítica, es necesario que se unan dos monómeros, formando de esta manera un homodímero. Las uniones entre ambos se producen por puentes salinos y los sitios activos de ambos monómeros están orientados simétricamente y lo más distante posible uno del otro. Estos, son capaces de alojar a los dos sustratos, el acetil-CoA y el acetoacetyl-CoA (ver figura 1.4) [10].

Mutación	Localización	Cambio en la proteína	Nº de familias	Referencia
c.1?_104+?del	E1	Del E1 (Hom.)	2	[14] [15]
c.160G>A	E2	p.V54M	1	[16]
c.167T>A	E2	p.I56N	1	[10]
c.252T>G	E2	p.Y84X	1	[10]
c.334C>T	E2	p.R112W	1	[17]
c.430G>T	E2	p.V144L	1	[17]
c.431_432del	E2	p.V144fs	1	[15]
c.437T>G	E2	p.M146R	1	[17]
c.500A>G	E2	p.Y167C	1	[16]
c.502G>A	E2	p.G168S	1	[15]
c.506G>A	E2	p.G169D	1	[14]
c.520T>C	E2	p.F174L	2	[15] [18]
c.553T>C	E2	p.W185R	1	[14]
c.563G>A	E3	p.R188H	1	[19]
c.634G>A	E3	p.G212R	3	[20] [21] [22]
c.656G>A	E3	p.G219E	1	[23]
c.695G>T	E4	p.G232V	2	[15] [24]
c.697A>G	E4	p.T233A	1	[10]
c.727A>G	E4	p.K243E	1	[10]
c.797T>C	E4	p.L266S	1	[14]
c.847C>T	E4	p.Q283X	2	[15] [24]
c.920T>C	E5	p.M307T	1	[19]
c.1016+1G>A	I5	IVS5+1G>A	1	[22]
c.1078T>C	E6	p.S360P	1	[15]
c.1162G>A	E6	p.G388R	2	[14] [25]
c.1175C>T	E6	p.S392L	1	[23]
c.1220T>C	E7	p.I407T	1	[14]
c.1270C>T	E7	p.R424X	2	[18] [25]
c.1499G>A	E9	p.R500H	2	[21] [23]
c.1498C>T	E9	p.R500C	1	[23]
c.1502G>A	E9	p.R501Q	1	[17]
c.1502G>C	E9	p.R501P	1	Este trabajo
c.1508A>G	E9	p.Y503C	1	[26]
c.1514G>A	E9	p.R505Q	1	[14]

Tabla 1.1 Mutaciones reportadas hasta la fecha del gen *HMGCS2*

Abreviaturas: *E*: exón; *I*: Intrón; *Del*: delección; *Hom*: homocigosis

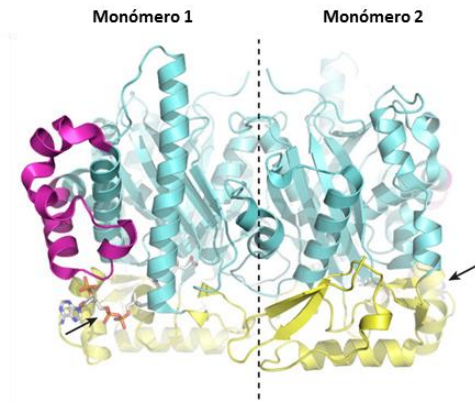


Figura 1.4 Estructura tridimensional del homodímero de mHS
Las flechas indican la localización de los sitios activos
 Modificado de [10]

1.2.3 Modelo bioinformático en 3D

En el año 2013, este laboratorio junto con la colaboración del Profesor Paulino Gómez Puertas del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa CSIC-UAM, realizaron el modelado estructural de la HMG-CoA sintasa mitocondrial humana, por homología de secuencias utilizando como molde la estructura cristalizada de la HMG-CoA sintasa citosólica (cHS) y gracias a herramientas bioinformáticas basadas en algoritmos para la predicción de estructuras tridimensionales [25].

Este modelo, junto con la estructura cristalina de la proteína mHS propuesta por Shafqat [10], se empleará para localizar y predecir el efecto final sobre la estructura proteica de las variantes descritas en este trabajo.

1.3 DEFICIENCIA DE HMG-COA SINTASA MITOCONDRIAL

La deficiencia de mHS (MIM #605911) pertenece a un grupo de enfermedades denominado Errores Congénitos del Metabolismo. Fue descrita por primera vez en 1997 [8]. Es muy poco frecuente, con una prevalencia inferior a 1:1000000 y de carácter autosómico recesivo. Se debe a mutaciones en homocigosis o heterocigosis compuesta en el gen *HMGCS2*. Hasta el momento se han reportado 35 casos en todo el mundo (ver tabla 1.3). En el anexo 1 se encuentra un resumen de los pacientes reportados hasta la fecha.

1.3.1 Manifestaciones clínicas y exploración física

Su clínica es muy inespecífica, motivo que podría explicar su baja prevalencia. La enfermedad suele ponerse de manifiesto en la infancia, tras enfermedades o situaciones en las que el aporte calórico está disminuido o se produce un estrés metabólico en el organismo, como son el ayuno, la gastroenteritis, la fiebre...

La enfermedad debuta con una clínica digestiva de náuseas y vómitos y, posteriormente, dificultad respiratoria, irritabilidad, letargia y estupor. Si el paciente no recibe tratamiento, puede progresar a encefalopatía, coma y muerte. Se ha relacionado con el Síndrome de Muerte Súbita del Lactante [8]. La presentación clínica, como en otras metabolopatías, puede ser similar al síndrome de Reye (*Reye-like*).

Dentro de la exploración física es posible hallar una leve hepatomegalia, que revierte rápidamente tras el tratamiento [27]. En la ecografía abdominal se puede observar un aumento de la ecogenicidad en dicho órgano. El ECG, el ecocardiograma, y el examen oftalmológico son normales [16].

1.3.2 Diagnóstico diferencial

La presentación clínica de estos pacientes es similar a la de aquellos que poseen alguna deficiencia a nivel de la β -oxidación de los ácidos grasos. No obstante, existen algunas características que nos permiten orientar el diagnóstico. Por ejemplo, la deficiencia de acetoacetil-CoA tiolasa se presenta típicamente con hipercetosis [8]. La hipoglucemia y el coma tienen un comienzo más temprano que en la deficiencia de acil CoA-deshidrogenasa de cadena media (MCAD), aunque en ésta última los pacientes no suelen sobrevivir al primer episodio [19].

		Deficiencia de mHS ¹	Deficiencia de HL ¹	
DATOS CLÍNICOS	Náuseas y vómitos	+/-	+/-	
	Diarreas	+/-	+/-	
	Hipotonía	-	+/-	
	Letargia	+/-	+/-	
	Respiración alterada	+/-	+/-	
	Coma	+/-	+/-	
	Hepatomegalia	+	+/-	
	Desarrollo normal	+	+/-	
	Secuelas/ fallecimiento	+/-	+/-	
DATOS BIOQUÍMICOS	Plasma	Hipoglucemia	+	+
		Hipocetonemia	+	+
		Hiperamoniemia	-	+/-
		Transaminasas	+/-	+/-
		Ácidos grasos libres	+/-	+/-
		Acidosis metabólica	+/-	+
		Acilcarnitinas normales	+	+/-
	Orina	Ácidos dicarboxílicos	+	-
		4-hidroxi-6-metil-2-pirona	+/-	-
		Ácido adípico	+/-	-
		Ácido 3-hidroxi-3-metilglutárico	-	+
		Ácido 3-hidroxi-isovalérico	-	+
		Ácido 3-metilglutacónico	-	+
		Ácido 3-metilglutárico	-	+

Tabla 1.2 Datos clínicos y bioquímicos en la deficiencia de mHS y de HL
Modificado de [28]

¹: +Siempre; - Nunca; +/- A veces

Es importante distinguir entre la deficiencia de mHS y de HL, enzima que interviene tanto en la ruta de la cetogénesis como en el catabolismo de la leucina [29]. La clínica en ambas es muy similar, pero existen algunas características que nos permiten diferenciarlas. En la deficiencia de HL, también denominada aciduria 3-hidroxi-3-metilglutárica, la clínica suele incluir a varios órganos. Las complicaciones a largo plazo, más frecuentes que en la deficiencia de mHS, incluyen macrocefalia, miopatías, retraso en el desarrollo y cardiopatía dilatada [28].

A nivel bioquímico, la principal diferencia es el patrón bioquímico típico en orina que presentan los pacientes con deficiencia de HL. Se observan niveles elevados de ácido 3-hidroxi-3-metilglutarárico, ácido 3-hidroxi-isovalérico, ácido 3-metilglutacónico y ácido 3-metilglutárico (ver tabla 1.2).

1.3.3 Pronóstico y tratamiento

Por lo general, el pronóstico de la enfermedad es favorable y los pacientes permanecen asintomáticos entre las crisis agudas. Pese a que en la mayoría de los pacientes no se producen secuelas tras los episodios, dos pacientes han fallecido a causa de complicaciones por la enfermedad, fundamentalmente a nivel cerebral [20] [26]. La hipoglucemia hipocetósica es un factor de riesgo para el daño cerebral [18].

El tratamiento tiene como objetivo prevenir la movilización de las grasas. Esto se consigue con la administración de fluidoterapia y glucosa por vía intravenosa, con la que rápidamente revierten los síntomas. La acidosis metabólica responde al aporte de bicarbonato. La hemodiafiltración en niños con un peso inferior a 10kg y la hemodiálisis en el resto de pacientes son los métodos de elección para la eliminación de moléculas potencialmente tóxicas y equilibrar el pH. La suplementación con L-carnitina también está indicada con el fin de eliminar posibles tóxicos [30]. Una vez han cesado los vómitos, se puede reanudar la alimentación por vía oral e ir reduciendo progresivamente la administración parenteral de sueros. Antes del alta es crucial comprobar que el niño puede tolerar al menos dos comidas sucesivas.

Como tratamiento de mantenimiento se recomienda una dieta baja en grasas y evitar periodos de ayuno prolongados. En situaciones de alto estrés metabólico estaría indicado el aporte calórico extra, así como antes de acostarse. Se ha planteado también que la ingesta rica en proteínas podría favorecer la ruta secundaria de la cetogénesis, facilitando la producción de cuerpos cetónicos [16].

1.4 DIAGNÓSTICO DE LA DEFICIENCIA DE mHS

1.4.1 Diagnóstico bioquímico

El dato analítico más importante durante las crisis agudas es la hipoglucemia con hipocetonemia. Los niveles de lactato, amonio y acilcarnitinas en plasma son normales [8]. Las transaminasas aparecen normales o discretamente elevadas [27]. En la gasometría arterial se puede encontrar una acidosis metabólica con anión gap aumentado [24]. El ratio ácidos grasos/ β -hidroxibutirato está elevado (>2,5). Las pruebas de ayuno suelen ser innecesarias para el diagnóstico, pero pueden ser útiles para evaluar la intolerancia al mismo [1].

En orina se encuentra abundante cantidad de ácidos dicarboxílicos. La enfermedad posee un perfil de excreción de metabolitos en orina inespecífico. No obstante, recientemente se han

propuesto la 4-hidroxi-6-metil-2-pirona (4-HMP) y el ácido adípico como nuevos metabolitos para su diagnóstico [14]. Encontrar unos valores de 4-HMP superiores a 20µmol/mmol creatinina y un ácido adípico por encima de 200 µmol/mmol creatinina permiten hacer un diagnóstico con un valor predictivo positivo del 80% [15].

1.4.2 Diagnóstico anatomopatológico

En la biopsia hepática pueden observarse alteraciones inespecíficas: leve infiltración grasa a nivel periportal, dilatación y proliferación del retículo endoplasmático, inclusiones cristalinas inespecíficas en algunas de las mitocondrias... Al tratarse de una prueba invasiva, poco específica y que proporciona poca información, rara vez se ha llevado a cabo dicho estudio [8] [27].

1.4.3 Estudio molecular del gen *HMGCS2*

Es el método de elección para confirmar la sospecha clínica de deficiencia de la enzima mHS. Para llevarlo a cabo se necesita disponer de una muestra de DNA genómico del paciente, que puede obtenerse a partir de los linfocitos presentes en una muestra de sangre periférica o de células desprendidas del epitelio de la mucosa oral.

Las técnicas empleadas para detectar mutaciones en el gen son: secuenciación Sanger de los exones y regiones intrónicas adyacentes obtenidos por reacción en cadena de la polimerasa (PCR); la técnica *Single-Strand Conformational Polymorphism* como método de screening; Southern-Blot y *Multiplex Ligation-Dependent Probe* (MLPA) para grandes deleciones; la técnica *Allele-Specific Oligonucleotide* (ASO) para el screening de mutaciones previamente encontradas [18].

1.4.4 Actividad enzimática

Hasta hace unos años, la única forma de medir la actividad enzimática de mHS era directamente a partir del homogeneizado hepático obtenido por biopsia [8]. Esta técnica presenta varios inconvenientes: es una técnica invasiva que requiere realizar una biopsia hepática al paciente y no ofrece unos resultados exactos y completamente fiables al poder encontrar actividad residual por acción de la isoforma citosólica cHS.

Nuestro grupo, con el fin de solventar estos inconvenientes, ha propuesto un método, incruento para el paciente, demostrando "in vitro" la actividad enzimática de la proteína en función de la mutación presente mediante mutagénesis dirigida, expresión de la proteína y ensayo enzimático [28].

Paciente	Sexo	Edad de debut	Genotipo	Referencia
1	H	6 a	F174L/F174L	[8]
2	H	1 a y 4 m	R424X/--	[27]
3	H	11 m	G212R/R500H	[21]
4	M	9 m	G212R/IVS5+1G>A	[22]
5	M	4 a y 6 m	V54M/Y167C	[16]
6	M	1 a y 7 m	V54M/Y167C	[16]
7	H	7 m	R188H/M307T	[19]
8	H	1 a	R188H/M307T	[19]
9	-	8 m	Del E1 (Hom.)	[14]
10	-	9 m	Del E1 (Hom.)	[14]
11	-	6 m	Del E1 (Hom.)	[14]
12	-	10 m	Del E1 (Hom.)	[14]
13	-	3 a y 1 m	L266S/I407T	[14]
14	-	6 m	G388R/G388R	[14]
15	-	-	G388R/G388R	[14]
16	-	2 a y 5 m	G169D/R505Q	[14]
17	-	8 m	G232V/Q283X	[24]
18	-	14 m	--/--	[24]
19	-	-	--/--	[31]
20	-	-	--/--	[31]
21	H	15 m	G388R/R424X	[25]
22	H	10 m	G212R/G212R	[20]
23	M	12 m	G212R/G212R	[20]
24	M	13 m	W185R/Y503C	[26]
25	M	8 m	S392L/R500H	[23]
26	H	6 m	G219E/R500C	[23]
27	-	1 a	Del E1 (hom.)	[15]
28	-	-	G212R/V144fs	[15]
29	-	-	G232V/Q283X	[15]
30	-	-	W185R/Y503C	[15]
31	-	-	S360P/S360P	[15]
32	-	-	G168S/F174L	[15]
33	H	3 m	R112W/--	[17]
34	H	-	V144L/V144L	[17]
35	M	6 m	R501Q/M146R	[17]

Tabla 1.3 Pacientes reportados con deficiencia de mHS
Abreviaturas: H: hombre; M: mujer; A: años; M: meses; Del: delección; Hom: homocigosis

OBJETIVOS

- 1. Caracterizar funcionalmente la mutación R501P del gen *HMGCS2* mediante mutagénesis dirigida, expresión de la proteína y ensayo enzimático.**
- 2. Comparar la actividad enzimática de la variante alélica R501P con los de la proteína WT y la variante R501Q, previamente reportada y de localización análoga en la proteína.**

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 DATOS CLÍNICOS DEL PACIENTE

El paciente a estudio es un varón, asintomático en el momento actual, sin que haya presentado una clínica aparente de deficiencia de HMG-CoA sintasa mitocondrial. Como hallazgo casual, se detecta mediante técnicas de secuenciación masiva la posible mutación R501P en heterocigosis que afecta al gen *HMGCS2*. A nuestro laboratorio se le ha solicitado caracterizar funcionalmente dicha mutación para comprobar su posible carácter patológico y sus efectos en la proteína mHS.

3.1.2 GEN *HMGCS2* Y VECTOR PMAL-c2X

Nuestro laboratorio dispone del vector de expresión pMAL-c2X, en el que previamente se ha insertado el gen *HMGCS2*. Este plásmido consta de 6646pb. Sus principales características son las siguientes (ver figura 3.1):

1. Origen de replicación autónomo, derivado del plásmido pBR322
2. Gen de resistencia a la ampicilina
3. Promotor "tac" (P_{tac}), inducible por isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG)
4. Gen represor $lacI^q$, que impide la transcripción en condiciones basales
5. Gen *malE* que codifica la proteína *maltose binding protein* (MBP)

La inserción de la secuencia de DNA a expresar se produce en una zona del vector llamada *polilinker* o "región de clonaje múltiple", una zona con múltiples sitios de corte enzimáticos. El gen *malE* está unido al *polilinker* a través de una zona de reconocimiento para la proteasa específica "Factor Xa". Esto va a permitir la separación de la proteína de interés, en este caso la enzima mHS, de la proteína MBP tras purificar.

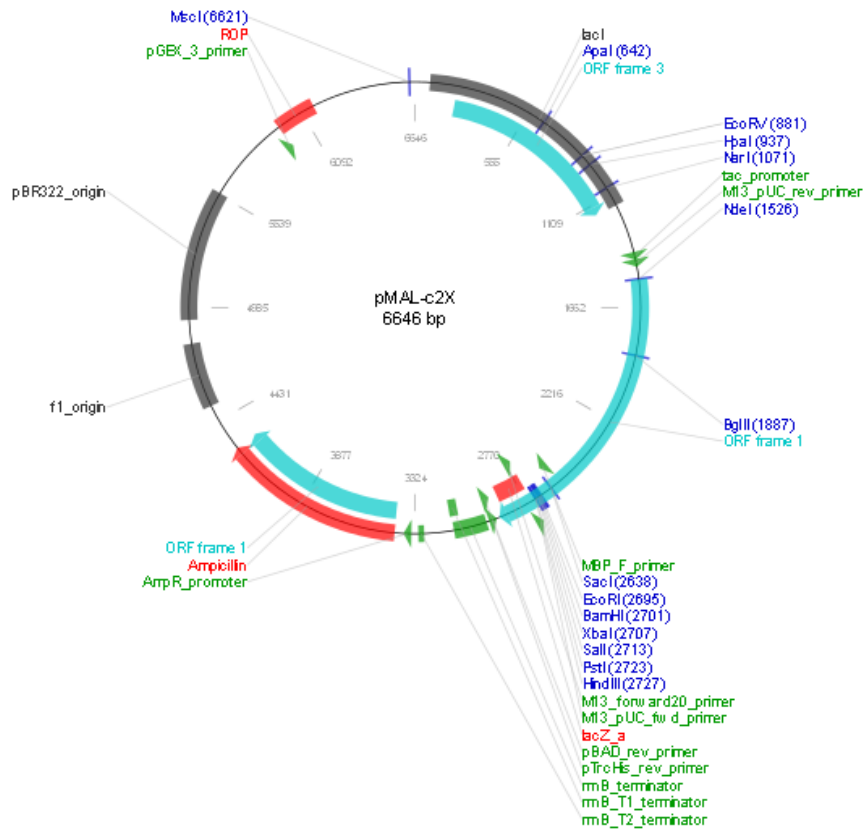


Figura 3.1. Mapa esquemático del vector pMAL-c2X

3.2 MÉTODOS

3.2.1 MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

Para el estudio funcional de cada variante hay que generar un mutante del gen *HMGCS2*, que previamente se ha insertado en el plásmido recombinante pMAL-c2X (pMAL-c2X-mHS). En este caso, se ha escogido el método de mutagénesis dirigida por PCR con el Kit “*QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis*” de Stratagene. El método a seguir consta de varias etapas (ver figura 3.2):

1. Desnaturalización del plásmido que contiene el gen a mutar
2. Ligación de los oligonucleótidos diseñados para introducir la mutación
3. Extensión con la enzima Pfu DNA polimerasa
4. Tratamiento con Dpn I para digerir las hebras metiladas sin mutar
5. Transformación del plásmido mutado en células XL1Blue
6. Reparación de las mellas por acción de una ligasa



Figura 3.2. Esquema del proceso de mutagénesis dirigida

3.2.1.1 PCR de la mutagénesis

El DNA empleado como molde ha sido el plásmido recombinante pMAL-c2X-mHS aislado de bacterias BL21. A continuación, se indican los primers utilizados, los componentes y las condiciones de la reacción (ver tablas 3.1 a 3.3):

PRIMERS	SECUENCIA 5'.....3'
HS_R501Q_F HS_R501Q_R	AGCAGCATCGCC A AAAGTATGCCCG CGGGCATACTTT T GGCGATGCTGCT
HS_R501P_F HS_R501P_R	AGCAGCATCGCC C AAAGTATGCCCG CGGGCATACTTT G GGCGATGCTGCT

Tabla 3.1 Primers utilizados en las reacciones de mutagénesis dirigida
En rojo se señala el nucleótido a mutar

Reactivos	Cantidad
Buffer 10x	5µl
pMAL-mHS	1,5µl
Primer F	1µl
Primer R	1µl
dNTPs	1µl
H ₂ O	39,5µl
Pfu Turbo® DNA polimerasa	1µl

Tabla 3.2 Componentes de la reacción de mutagénesis dirigida

	Temperatura	Tiempo	
Inicio	95 °C	1'	12 ciclos
Desnaturalización	95 °C	30''	
Hibridación	55 °C	30''	
Extensión	68 °C	10'	
Extensión final	68 °C	10'	

Tabla 3.3 Condiciones de la reacción de mutagénesis dirigida

3.2.1.2 Digestión enzimática

Tras finalizar la reacción previa, se añade 1µl de enzima DpnI al producto resultante y se incuba a 37 °C durante 1 hora (ver figura 3.3):

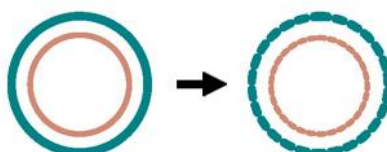


Figura 3.3 Esquema del proceso de digestión enzimática con DpnI

Las hebras de DNA originales, a diferencia de las que contienen la mutación, se encuentran metiladas o hemimetiladas. La enzima Dnpl, una endonucleasa de restricción, va a cortar el DNA en la secuencia GATC de aquellas hebras que se encuentren metiladas. De este modo, se van a eliminar todas las que no hayan mutado.

3.2.1.3 Transformación de XL1-Blue

Una vez generado el vector con la mutación, debe introducirse en una célula competente capaz de admitir el DNA exógeno. Este proceso, conocido como transformación, se lleva a cabo en bacterias *Escherichia coli* XL1-Blue mediante choque térmico (Protocolo: ver anexo 2.1).

3.2.1.4 Selección de colonias positivas

El siguiente paso será seleccionar aquellas colonias de bacterias XL1-Blue, previamente cultivadas en el medio sólido LB-ampicilina, que hayan incorporado el plásmido pMAL-c2X-mHS. Este medio contiene un antibiótico perteneciente al grupo de los β -lactámicos, la ampicilina (ver figura 3.4), que actúa sobre la biosíntesis de la pared celular bacteriana, teniendo, por lo tanto, actividad bactericida.

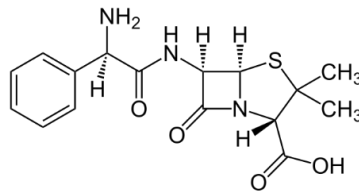


Figura 3.4 Estructura química de la ampicilina

El vector pMAL-c2X-mHS porta el gen de resistencia *bla*, que codifica la enzima periplasmática β -lactamasa, con capacidad para romper el anillo β -lactámico de la ampicilina. De este modo, solamente aquellas bacterias XL1-Blue que hayan incorporado el plásmido correctamente van a ser capaces de crecer en el medio.

a. PCR boiling

Esta técnica se basa en el método de PCR convencional, pero utilizando células en lugar de DNA directamente. Éstas, al ser sometidas a elevadas temperaturas, se lisan y liberan su material genético a la disolución. Para llevarlo a cabo se preparará la mezcla de PCR y sobre ella se añadirá aquella colonia que haya crecido en el medio. Se prepararán tantas mezclas como colonias queramos analizar.

Posteriormente, se comprueban los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. Se considerarán colonias positivas todas aquellas que hayan amplificado el inserto del tamaño adecuado (1400pb). A continuación, se indican los primers utilizados, los componentes y las condiciones de la reacción (ver tablas 3.4 a 3.6):

Primers	Secuencia 5'.....3'
mHS_EcoF	AAGGGAATTCACAGCCTCTGCTGTC
mHS_EcoR	CTTCCATGGATCCGCAGAACAC

Tabla 3.4. Primers utilizados en la reacción de PCR boiling

Reactivos	Cantidad
Master Mix	7,5µl
Primer F (20 ng/µl)	0,5µl
Primer R (20 ng/µl)	0,5µl
H ₂ O	11µl
"picar" colonia	-

Tabla 3.5. Componentes de la reacción de PCR boiling

	Temperatura	Tiempo	
Inicio	95 °C	1'	35 ciclos
Desnaturalización	95 °C	30"	
Hibridación	54 °C	30"	
Extensión	72 °C	1'45"	
Extensión final	68 °C	5'	

Tabla 3.6. Condiciones de la reacción de PCR boiling

b. Secuenciación de colonias positivas

En todas las colonias en las que se confirme la inserción del plásmido, se deberá comprobar que expresa la mutación deseada y ninguna otra. Para ello, se llevará a cabo el aislamiento del DNA plasmídico mediante "miniprep". Antes de llevarlo a cabo, se "picará" cada una de las colonias positivas, previamente chequeadas por PCR boiling y se inocularán por separado en 6,5ml de medio LB-ampicilina líquido. Se cultivarán durante 12 horas a 37°C y 150rpm de agitación ([Protocolo: ver anexo 2.4](#)).

El método de "miniprep" está basado en la lisis celular mediante choque alcalino y su posterior neutralización. Bajo estas condiciones, el DNA cromosómico y el resto de componentes celulares van a precipitar. El DNA plasmídico, por el contrario, permanecerá en disolución. Posteriormente, para eliminar posibles impurezas, se pasará la mezcla por una columna de sílice en presencia de una disolución de elevada fuerza iónica. Se eluirá y aislará con la ayuda de una solución de baja fuerza iónica. Para realizar este procedimiento se empleará el Kit "GeneJET Plasmid Miniprep Kit" de Fermentas.

Una vez el plásmido esté aislado y puro, se procederá a preparar la mezcla de la reacción de secuenciación. En este caso se ha utilizado un método de secuenciación automática basado en el uso de dideoxinucleótidos marcados con distintos fluorocromos. Para ello, hay que disponer de 250-375ng de DNA ([Protocolo: ver anexo 2.5](#)).

3.2.1.5 Transformación de BL21

Tras aislar el DNA plasmídico con la mutación, se transformarán las cepas *E. coli* BL21-Codon Plus® (DE3)-RIPL de Stratagene, para la expresión y purificación de la proteína recombinante. Los protocolos a realizar son los descritos en los puntos 3.2.1.3 y 3.2.1.4, pero esta vez con la cepa BL21 y en vez de 5µl de producto de PCR, se debe añadir 5µl de plásmido pMAL-c2X-mHS con la mutación.

3.2.2 EXPRESIÓN DE MUTANTES Y OBTENCIÓN PROTEICA

Los pasos a seguir para obtener tanto la proteína mHS-WT pura, como el resto de proteínas mutadas son los siguientes: inducción de la expresión del clon recombinante, lisis del cultivo celular, purificación mediante cromatografía en columna de amilosa y corte de la proteína de fusión con una proteasa específica.

3.2.2.1 Inducción de la expresión

Una vez transformada la cepa *E. coli* BL21-Codon Plus® (DE3)-RIPL con el plásmido recombinante pMAL-c2x-mHS, se procederá a la expresión de la proteína recombinante mediante la inducción con IPTG. Este es un inductor del promotor “tac”, al que se une de manera irreversible. Esta unión impide la represión ejercida por la proteína codificada por el gen *lacI*^q, estimulando así la transcripción del DNA ([Protocolo: ver anexo 2.6](#)).

3.2.2.2 Lisis celular

Para poder extraer las proteínas previamente inducidas, se debe romper la membrana celular de las bacterias. Para llevarlo a cabo, se empleará un tratamiento por choque térmico con lisozima ([Protocolo: ver anexo 2.7](#)).

3.2.2.3 Purificación y corte de la proteína de fusión

Como ya se ha comentado, el plásmido en el que hemos clonado la proteína es un plásmido de fusión, que nos va a codificar nuestra proteína unida a la proteína MBP. Esta proteína, además de facilitar el proceso de purificación, va a dar estabilidad a las proteínas con las que se co-expresa.

El proceso consiste en la purificación de proteína mediante cromatografía en columna con resina de amilosa. La MBP, unida a la proteína recombinante, tiene gran afinidad por la amilosa, por lo tanto, quedará retenida en la columna y el resto de proteínas celulares serán eluidas.

Una vez aislada la proteína de fusión mHS-MBP, es posible separar las dos proteínas mediante el corte con una proteasa específica, el Factor Xa. Esta proteasa reconoce y corta la secuencia de 4 aminoácidos que existe entre la MBP y la mHS, por lo que la MBP quedará unida a la resina de amilosa mientras que la mHS quedará en disolución. Para la realización de la purificación se utilizará el Kit “pMALTM Protein Fusion and Purification System” de New England Biolabs ([Protocolo: ver anexo 2.8](#)).

3.2.3 CUANTIFICACIÓN PROTEICA

Con el fin de comprobar los resultados obtenidos con el procedimiento de expresión de proteínas recombinantes, se detallan los métodos de cuantificación e identificación proteicas con el Método Bradford y la técnica de Western Blot.

3.2.3.1 Método Bradford

Para determinar la concentración de proteína total obtenida, se debe realizar el método Bradford. Es un método colorimétrico de cuantificación de proteínas basado en el cambio de absorbancia que se produce a 595nm cuando interaccionan un colorante hidrofóbico, el azul de Coomassie, con el interior hidrofóbico de las proteínas.

El colorante se torna de color pardo a azulado y el máximo de absorción del colorante cambia de 465nm a 595nm. El cambio de absorbancia a 595nm es proporcional a la concentración de la proteína en la muestra. Este método es muy sensible a determinadas sustancias y detergentes, pero rápido y fácil de llevar a cabo.

Para su realización es necesaria la preparación de una curva de calibrado empleando una proteína patrón, la albúmina de suero bovino (BSA), y el reactivo Bradford (*Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate*).

El procedimiento a seguir se muestra a continuación:

1. Preparar una solución de 1:5 de reactivo Bradford.
2. Partiendo de una solución de BSA a 1mg/ml y con el reactivo Bradford como disolvente, preparar muestras de manera que las concentraciones finales de BSA estén en el rango de 0 a 15µg/ml de BSA.
3. Medir por triplicado la absorbancia a 595nm en el espectrofotómetro.

Una vez se tenga la recta patrón establecida, se procederá a medir la concentración de cada una de las proteínas recombinantes (WT y mutantes), preparando una disolución con 5µl de proteína purificada y 100µl de reactivo Bradford a 1:5. Se medirá la absorbancia a 595nm y el valor se extrapolará en la recta patrón, dándonos así la concentración de proteína total en la mezcla.

3.2.3.2 Western Blot

La comprobación de la correcta expresión y purificación de las proteínas se llevará a cabo por electroforesis en geles SDS-PAGE y la metodología Western Blot. Para la electroforesis SDS-PAGE se utilizarán geles de poli(acrilamida) Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Precast Gels de Bio-Rad.

La electroforesis en geles de poli(acrilamida)-SDS es una técnica que permite la separación de proteínas en función de su tamaño y su identificación por comparación con un patrón de pesos moleculares. Las proteínas son disociadas mediante la acción del SDS (detergente aniónico), de un agente reductor y del calor. Las proteínas van a migrar en función de su tamaño y no de su secuencia.

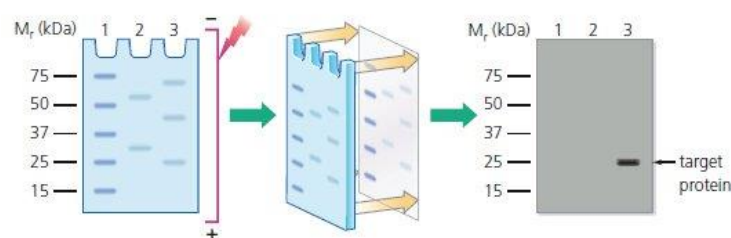


Figura 3.5 Esquema del proceso de electroforesis en geles SDS y Western Blot

Los geles están formados por cadenas polimerizadas de acrilamida que se entrecruzan con cadenas de bisacrilamida formando mallas. Con el fin de mejorar la separación, la electroforesis es discontinua mediante dos geles de distinta porosidad. Las proteínas inicialmente atraviesan un gel concentrador (de tamaño de poro mayor) acumulándose en la interfase, a partir de la cual atraviesan el gel resolutivo (tamaño de poro menor), donde se separarán de manera individual.

Antes de realizar la carga, se someterá a las muestras a un pretratamiento con tampón de carga, el cual contiene β -mercaptoetanol y SDS, que romperán los puentes disulfuro, desnaturalizando así las proteínas. Este tampón de carga debe ser preparado en el momento de su uso y está formado por dos soluciones (ver tablas 3.7 y 3.8).

En cada pocillo se cargará la misma concentración de cada una de las proteínas recombinantes. La mezcla de carga contendrá dos volúmenes de solución proteica y un volumen de tampón de carga. Se hervirá a 100°C durante 5 minutos. Posteriormente, se guardará a 4 °C hasta su uso.

Reactivos	Concentración
SDS	6% (v/v)
β -mercaptoetanol	15% (v/v)
TRIS 0,5M pH 6,8	130nM

Tabla 3.7 Composición de la solución 1 del tampón de carga

Reactivos	Concentración
Sacarosa	20%
Azul de bromofeno (BPB)	0,05%
Agua c.s.p	50ml

Tabla 3.8 Composición de la solución 2 del tampón de carga

La técnica Western Blot combina la especificidad de los anticuerpos con la resolución de las técnicas electroforéticas. Las proteínas previamente cargadas y separadas en un gel de electroforesis son transferidas a una membrana de material sintético mediante la aplicación de un campo eléctrico perpendicular a ambos. Con la proteína inmovilizada en la membrana, se procede a la detección inmunológica mediante la incubación con el anticuerpo específico. El complejo antígeno-anticuerpo generado se visualizará por inmunoensayo enzimático indirecto con un anticuerpo secundario.

Se usa un sustrato cromogénico que genera un producto insoluble. Es una técnica muy útil que permite la identificación de una determinada proteína y la determinación de su masa molecular.

Como marcador de pesos moleculares se empleará “*Prestained SDS-PAGE Standards, Broad Range*” de Bio-Rad ([Protocolos: ver anexos 2.9 y 2.10](#)).

3.2.4 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La medida de actividad de las proteínas obtenidas se llevará a cabo con el método de espectrofotometría de absorción molecular a 304nm. Como el acetoacetil-CoA es el único componente de la reacción que puede absorber a esta frecuencia de onda, puede monitorizarse el consumo de este reactivo y cuantificar así la actividad de la enzima mHS. A continuación, se muestra la reacción:

Acetil-CoA + Acetoacetil-CoA



HMG-CoA sintasa mitocondrial

HMG-CoA + CoA

Como blanco se tomará la medida de la cubeta con la mezcla de reacción (ver tabla 3.9) sin acetoacetil-CoA ni enzima a 304nm. Por otro lado, dado que el acetoacetil-CoA es capaz de degradarse espontáneamente en disolución, se monitorizará una disolución que contenga 997µl de mezcla de reacción y 3µl de acetoacetil-CoA cada minuto durante 10 minutos. Este valor corresponderá a la desaparición de acetoacetil-CoA sin acción de la enzima mHS, y por lo tanto, se restará a los valores de absorbancia obtenidos para cada una de las proteínas recombinantes. El procedimiento a seguir se muestra a continuación:

1. Preparar en un eppendorf la mezcla de acetilación: añadir 6µl de Acetil-CoA a 1mM y 12µl de enzima a ensayar.
2. Incubar 17 minutos a 30°C.
3. Añadir 15µl de enzima acetilada sobre 982µl de mezcla de reacción (Tabla 3.9) en una cubeta de cuarzo.
4. Añadir 3µl de Acetoacetil-CoA a 25mM y mezclar por inversión.
5. Medir la absorbancia a 304nm durante 10 minutos.
6. Repetir la operación 3 veces para cada una de las enzimas.

Reactivos	Cantidad
MgCl ₂ (1M)	5µl
BSA (1mg/ml)	10µl
Acetil-CoA 25 mM	8µl
Tampón TRIS-EDTA pH 8,2	959µl

Tabla 3.9 Composición de la mezcla de reacción

3.2.4.1 Cálculo del coeficiente de extinción molar

Para poder establecer la actividad enzimática de la enzima mHS se deberá calcular el coeficiente de extinción molar (ϵ) del acetoacetil-CoA. Para ello, se prepararán las mezclas de reacción sin enzima (ver tabla 3.9), a las que se les añadirán concentraciones crecientes de acetoacetil-CoA (0, 1, 2, 5 y 10mM). Se medirá la absorbancia de cada una de las mezclas a 304nm cada minuto durante 10 minutos. Posteriormente se calculará el Δ Abs entre 5 y 10 minutos.

Según la ley de Lambert-Beer:

$$\Delta\text{Abs} = \epsilon \cdot l \cdot c$$

Δ Abs → Incremento de absorbancias
 ϵ → Coeficiente de extinción molar
 l → Anchura de la cubeta (1 cm)
 c → Concentración de acetoacetil-CoA

El coeficiente de extinción molar (ϵ) es, por lo tanto, igual al cociente entre el incremento de absorbancias y la concentración de acetoacetil-CoA. Si lo representamos de manera gráfica, se obtiene una recta con pendiente igual a ϵ .

3.2.4.2 Cálculo de la actividad enzimática

Los cálculos de actividad enzimática se llevarán a cabo aplicando la ecuación de Lambert-Beer: la diferencia entre lo absorbido por la muestra y por el blanco es proporcional al número de moles de acetoacetil-CoA que se han consumido en la reacción. De esta manera, la actividad enzimática será igual al número de moles que desaparecen de sustrato por unidad de tiempo:

$$[\text{Acetoacetil-CoA}] = \frac{A_{\text{blanco}} - A_{\text{muestra}}}{\epsilon}$$
$$\text{Actividad enzimática} = \frac{\Delta[\text{Acetoacetil-CoA}]}{\Delta t}$$

3.2.5 PREDICCIÓN BIOINFORMÁTICA

El modelo bioinformático desarrollado en colaboración del Profesor Paulino Gómez Puertas, junto con la estructura cristalina de la proteína mHS propuesta por Shafqat [10], se emplearán para localizar y predecir el efecto final sobre la estructura proteica de las variantes descritas en este trabajo.

RESULTADOS

4.1 ESTUDIO FUNCIONAL “IN VITRO”

A continuación se describen los resultados obtenidos para cada una de las proteínas recombinantes analizadas mediante el método de ensayo enzimático “in vitro” desarrollado en este laboratorio:

4.1.1 Mutagénesis dirigida

Se han creado de manera individual los mutantes *missense* de la enzima mHS a estudio. Las mutaciones y los cambios de nucleótidos introducido en el plásmido pMAL-c2X-mHS se observan en la tabla 4.1:

Mutación	Cambio a nivel de DNA	Referencia
R501P	c.1502G>C	No reportado
R501Q	c.1502G>A	[17]

Tabla 4.1. Variantes alélicas a estudio

Como DNA molde para las reacciones de mutagénesis se ha utilizado el plásmido pMAL-c2X-mHS. La introducción de la mutación se ha realizado siguiendo los procesos descritos en el punto 3.2.1.

Tras la transformación en bacterias XL1-Blue se aisló el DNA plasmídico mediante “*miniprep*” y por secuenciación Sanger se confirmó la presencia de las variante alélicas. Esto permitió comprobar que no se habían introducido mutaciones no deseadas.

En las figura 4.1 y 4.2 se muestran las secuencias correspondientes a la región con la variación de cada uno de los plásmidos mutantes aislados de las bacterias BL21. Se indica la comparación de la secuencia mutada (R501P y R501Q) con la secuencia WT. Para las bacterias XL1-Blue estas secuencias fueron idénticas.

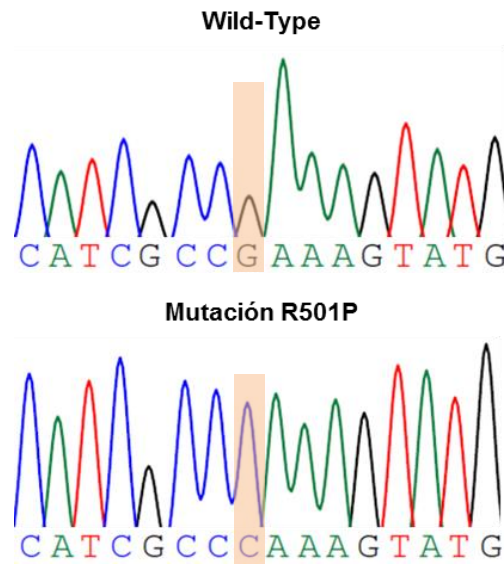


Figura 4.2. Secuencia en forward del plásmido pMAL-mHS con la mutación R501P

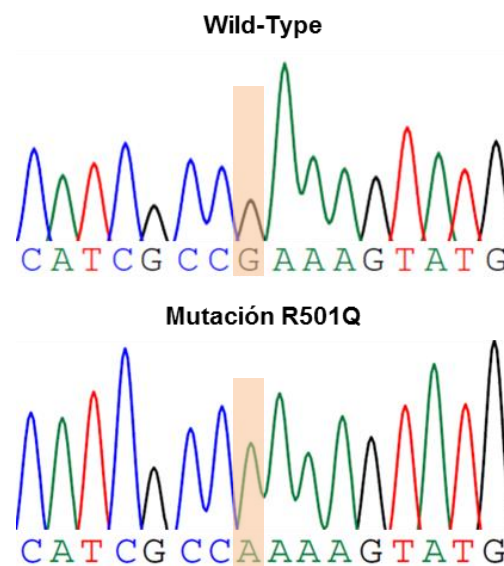


Figura 4.1. Secuencia en forward del plásmido pMAL-mHS con la mutación R501Q

4.1.2 Método Bradford

La solución obtenida tras la purificación se cuantificó antes de llevar a cabo el Western-Blot, para poder después normalizar según concentración. Para llevar a cabo la cuantificación de la concentración de proteína total en la fracción soluble se estableció una recta patrón (ver punto 3.2.3.1). Los resultados pueden verse en la figura 4.3:

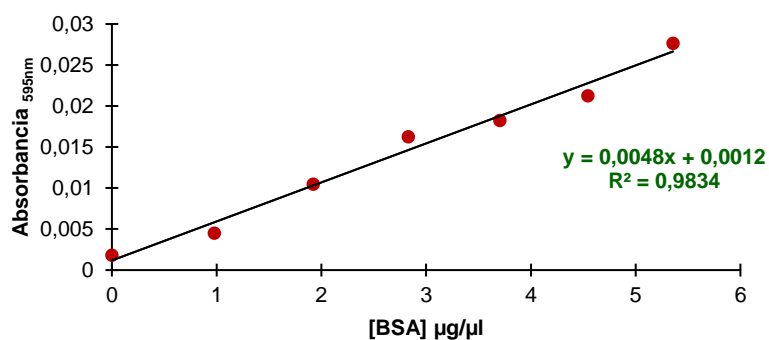


Figura 4.3 Recta de calibrado de la proteína BSA

A continuación se midieron las absorbancias a 595 nm del resto de proteínas recombinantes y se extrapolaron estos valores a la recta de calibrado. Los valores de proteína total obtenidos pueden verse en la tabla 4.2:

Mutación	Absorbancia _{595nm}	Proteína total (µg/µl)
Wild-Type	0,057	0,298
R501P	0,046	0,241
R501Q	0,059	0,304

Tabla 4.2 Valores de concentración de proteína total

4.1.3 Western Blot

Como puede observarse en la figura 4.4, se ha logrado sobreexpresar la enzima WT y los mutantes de mHS (52kDa). Todos van acompañados de restos de proteína MBP (43kDa), que no ha sido totalmente eliminada con el método de purificación.

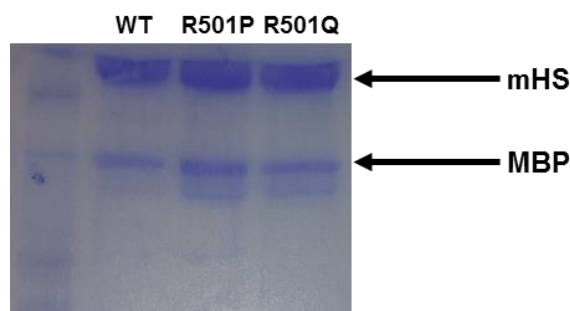


Figura 4.4 Tinción Coomassie en membrana con patrón de bandas de la mHS WT y las enzimas mHS mutadas

Con el fin de demostrar que la proteína observada a 52kDa se corresponde a la proteína mHS recombinante, se realizó un Western Blot con anticuerpos específicos anti-mHS. En la figura 4.5 observamos que todas las proteínas mHS están presentes en cada una de las enzimas sobreexpresadas.

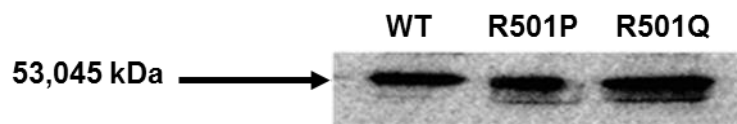


Figura 4.5 Western Blot de la parte soluble utilizando anticuerpos anti-mHS

4.1.4 Ensayo de la actividad enzimática

Para poder calcular la actividad enzimática, es necesario conocer el coeficiente de extinción molar (ϵ) del acetoacetyl-CoA en las condiciones de reacción. Para ello, se añadieron concentraciones crecientes de acetoacetyl-CoA a la mezcla de reacción y se midió la absorbancia a 304nm. El valor se ha obtenido calculando la pendiente de la recta de regresión (ver figura 4.6).

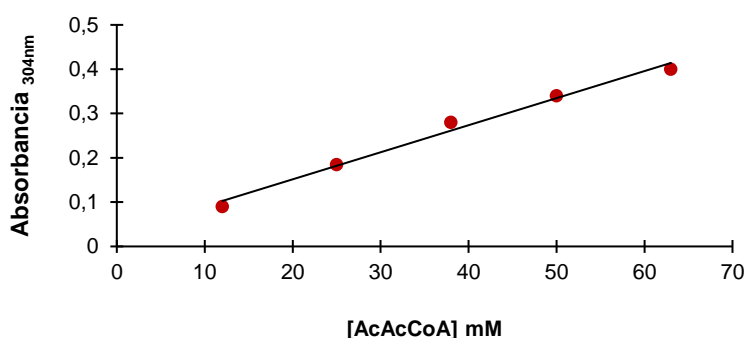


Figura 4.6 Cálculo del coeficiente de extinción molar del acetoacetyl-CoA

Atendiendo a la fórmula de Lambert-Beer (ver punto 3.2.4.1), vemos que el coeficiente de extinción molar corresponde a la pendiente de la recta de regresión. Su valor resultó ser $0,006889\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Para los cálculos de actividad enzimática se midió la cantidad de acetoacetyl-CoA que hay en disolución. Debido a que el acetoacetyl-CoA sufre degradación al estar en disolución, primero se procedió a medirla cantidad que se degrada sin actuación enzimática, obteniendo así un factor de corrección.

Aplicando este factor de corrección se ha determinado cuál era la cantidad de acetoacetyl-CoA que desaparecía por acción de la enzima y no por degradación. Siguiendo el proceso que se detalla en el punto 3.2.4.1, el factor de corrección de absorbancia obtenido fue de 0,035 (ver tabla 4.3).

Tiempo	Blanco	WT			R501P			R501Q		
5 min	0,63	0,35	0,529	0,491	0,605	0,67	0,665	0,685	0,688	0,704
10 min	0,595	0,21	0,408	0,367	0,582	0,644	0,642	0,654	0,662	0,672
A (5-10)	0,035	0,1283*			0,024*			0,0297*		

Tabla 4.3 Medidas de absorbancia de acetoacetyl-CoA

*El valor corresponde a la media de los valores de las tres medidas

Las medidas de actividad se realizaron según se describe en el punto 3.2.4.1. Una vez aplicado el factor de corrección y hechos los cálculos pertinentes, únicamente se pudo detectar actividad en la proteína WT. En la tabla 4.4 se muestran los resultados en forma de actividad enzimática y actividad enzimática específica, y el tanto por ciento de actividad específica con respecto a la enzima WT.

Mutación	Actividad ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	Actividad específica ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}_{\text{enzima}}$)	Porcentaje
Wild-Type	2,709	$0,910 \pm 0,0996$	100%
R501P	-0,319	$-0,013 \pm 0,021$	0%
R501Q	-0,155	$-0,051 \pm 0,031$	0%

Tabla 4.4 Medidas de actividad enzimática

4.2 PREDICCIÓN BIOINFORMÁTICA

4.2.1 Variantes alélicas R501P y R501Q

El aminoácido arginina (Arg^{501}) forma un puente salino con el aminoácido ácido aspártico (Asp^{101}), estabilizando mediante una unión de larga distancia la hélice α^3 y la lámina β^{17} . El cambio que se produce en la Arg^{501} , residuo positivo, por prolina en la variante R501P y por glutamina en la variante R501Q, seguramente perturbe la interacción con Asp^{101} , cargado negativamente. El efecto producido en ambos casos será la distorsión de una zona de la proteína próxima a la superficie de dimerización.

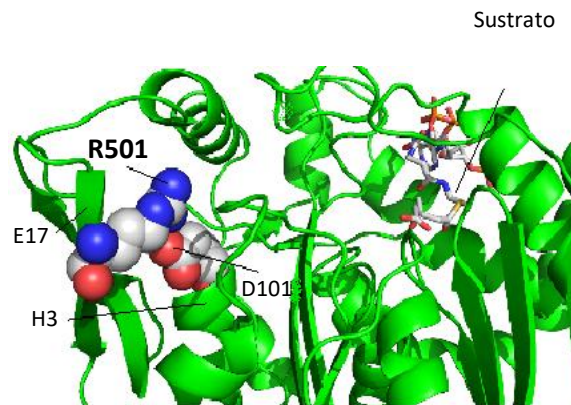


Figura 4.6 Localización del aminoácido Arg^{501} en la enzima mHS

DISCUSIÓN

5.1 ESTUDIO FUNCIONAL “IN VITRO”

Hasta la fecha, nuestro laboratorio es el único a nivel mundial que ha conseguido llevar a cabo de forma eficiente una técnica de ensayo de actividad enzimática “in vitro” de la proteína mHS humana. Este método consiste en un sistema de clonaje, expresión y medida de la enzima en bacterias de *E. coli* usando el vector de expresión pMAL-c2X-mHS.

En este trabajo se ha utilizado dicho método para medir la actividad enzimática de una nueva variante alélica del gen *HMGCS2*, la mutación R501P. Además, se han comparado los resultados con los de la proteína WT y la variante R501Q, previamente reportada y de localización análoga en la proteína.

El valor obtenido para la concentración final de proteína WT ha sido de 0,298µg/µl. Los valores para las proteínas mutadas R501P y R501Q han sido 0,241µg/µl y 0,304µg/µl respectivamente. La actividad específica de la proteína WT fue de 0,910 µmol/min*mg de enzima. En cuanto a las variantes alélicas, se han logrado obtener estables en disolución, pero sin llegar a presentar actividad enzimática.

Como se ha comentado previamente, la enzima mHS es un monómero que necesita unirse a otro para tener actividad catalítica [10]. Por lo tanto, mutaciones que afecten a la superficie de dimerización o al centro catalítico podrían explicar la obtención de proteínas estables en disolución, pero sin presentar actividad.

Aunque el diagnóstico de la deficiencia de mHS es difícil por su poca especificidad, recientemente se ha propuesto un perfil de excreción de metabolitos en orina con la determinación de valores elevados de 4-HMP y de ácido adípico [14] [32]. No obstante, el hecho de no estar presentes en todos los pacientes hace que el estudio molecular y la caracterización funcional de las mutaciones “in vitro” sean los métodos de elección para estudiar a estos pacientes.

5.2 LOCALIZACIÓN Y EFECTO DE LAS VARIANTES

Dentro de la estructura realizada en la predicción bioinformática (ver punto 4.2.1) podemos ver que la arginina forma un puente salino con el aspartato, estabilizando mediante una unión de larga distancia la hélice α^3 y la lámina β^{17} . Este es un residuo conservado tanto en *HMGCS2* de mamíferos como en su homóloga citosólica (cHS) e incluso en HMG-CoA sintasas tan alejadas filogénicamente como las de bacterias y plantas.

En la variante R501P, el cambio que se produce en la arginina, residuo hidrofílico cargado positivamente y de gran tamaño por prolina, residuo hidrofóbico alifático y de pequeño tamaño, seguramente perturbe la interacción con el aspartato, residuo hidrofílico cargado negativamente y de pequeño tamaño.

En la variante R501Q, el cambio que se produce en la arginina, residuo hidrofílico cargado positivamente y de gran tamaño por glutamina, residuo hidrofílico sin carga, seguramente perturbe la interacción con el aspartato, residuo hidrofílico cargado negativamente y de pequeño tamaño.

Por lo tanto, el efecto que se producirá en ambas mutaciones será la distorsión de una zona de la proteína próxima a la superficie de dimerización. La ausencia de actividad catalítica se justificaría entonces al estar afectada la unión de ambos monómeros.

5.3 VENTAJAS Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO

La mayor parte de los estudios funcionales de la enzima mHS se han realizado a partir de la proteína procedente de extractos crudos de hígado [8]. Siendo este un procedimiento complejo, con un gran número de pasos hasta su completa purificación. Además de ser una técnica invasiva para el paciente y no estar exenta de interferencias, fundamentalmente por la actividad residual de la isoforma HMG-CoA sintasa citosólica humana (cHS).

Con el estudio de las variantes alélicas, se puede determinar con precisión la actividad enzimática de un dímero cuyos monómeros contengan la misma mutación. Es decir, en aquellos pacientes que presenten una mutación en homocigosis. Sin embargo, en pacientes con mutaciones en heterocigosis compuesta se desconoce cuál va a ser la proporción de cada monómero y cómo se van a unir para la formación de los dímeros.

Es muy probable que muchos de estos pacientes nunca lleguen a debutar con la enfermedad o tengan unos síntomas muy leves, lo que puede condicionar que pase desapercibida la deficiencia y condicione su baja prevalencia. Todos estos aspectos hacen difícil establecer unas adecuadas relaciones genotipo-fenotipo en estos pacientes, lo que dificulta conocer el pronóstico y poder hacer un adecuado consejo genético a la familia.

Los estudios realizados previamente sobre la enzima mHS pensaban que dicha proteína era inestable "in vitro" [18]. Los resultados de este trabajo, junto con los obtenidos previamente en nuestro laboratorio demuestran lo contrario [17] [28]. Este método consigue obtener una enzima estable en disolución, activa y con un alto grado de pureza. Además, nos ofrece la posibilidad de realizar estudios de cualquier variante alélica de la mHS mediante mutagénesis dirigida sobre el plásmido pMAL-c2x-mHS.

Todo ello convierte a la técnica de clonaje, expresión y ensayo enzimático de la HMG-CoA sintasa mitocondrial humana como el método de elección para llegar a un diagnóstico de certeza de la enfermedad.

CONCLUSIONES

1. Se ha reportado por primera vez la mutación patológica R501P del gen *HMGCS2*.
2. Se ha comprobado la buena reproductibilidad del método de expresión, purificación y ensayo enzimático de la enzima mHS humana. Se ha obtenido una concentración de 0,298µg/µl y una actividad enzimática de 0,910 U/mg de la proteína wild type.
3. Mediante mutagénesis dirigida en el plásmido pMAL-c2x-mHS se ha conseguido introducir la mutación R501P en la secuencia de la proteína.
4. Mediante técnicas de expresión se ha conseguido obtener soluble la proteína mutada R501P con una concentración de 0,241µg/µl.
5. El ensayo enzimático de la proteína mutada ha mostrado una ausencia absoluta de actividad.
6. Los estudios bioinformáticos sugieren que la mutación R501P, al igual que la ya descrita R501Q, altera la superficie de dimerización de la enzima HMG-CoA sintasa mitocondrial humana.

BIBLIOGRAFÍA

1. Fukao T, Mitchell G, Sass JO, Hori T, Orii K, Aoyama Y. Ketone body metabolism and its defects. *J Inherit Metab Dis*. 2014;37(4):541-51.
2. Grabacka M, Pierzchalska M, Dean M, Reiss K. Regulation of ketone body metabolism and the role of PPAR α . *Int J Mol Sci*. 2016;17(12):2093.
3. Nelson DL, Cox MM. Catabolismo de los ácidos grasos. En: *Lehninger Principios de Bioquímica*. 6.^a ed. Barcelona: Omega; 2014. p. 1328-9.
4. Albero R, Sanz A, Playán J. Metabolismo en el ayuno. *Endocrinol Nutr*. 2004;51(4):139-48.
5. Sass JO. Inborn errors of ketogenesis and ketone body utilization. *J Inherit Metab Dis*. 2012;35(1):23-8.
6. Zeng Z, Liu F, Li S. Metabolic adaptations in pregnancy: a review. *Ann Nutr Metab*. 2017;70(1):59-65.
7. Céspedes C, Bustos C. Manejo de la cetoacidosis diabética en niños y adolescentes. *Endocrinol Nutr*. 2008;55(7):289-96.
8. Thompson GN, Hsu BYL, Pitt JJ, Treacy E, Stanley CA. Fasting hypoketotic coma in a child with deficiency of mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase. *N Engl J Med*. 1997;337(17):1203-7.
9. McGarry JD, Brown NF. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system - From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem*. 1997;244(1):1-14.
10. Shafqat N, Turnbull A, Zschocke J, Oppermann U, Yue WW. Crystal structures of human HMG-CoA synthase isoforms provide insights into inherited ketogenesis disorders and inhibitor design. *J Mol Biol*. 2010;398(4):497-506.
11. Gil G, Goldstein JL, Slaughter CA, Brown MS. Cytoplasmic 3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A synthase from the hamster. *J Biol Chem*. 1986;261(8): 3717-24.
12. Mascaró C, Buesa C, Ortiz JA, Haro D, Hegardt FG. Molecular cloning and tissue expression of human mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase. *Arch Biochem Biophys*. 1995;317(2):385-90.

13. Boukaftane Y, Duncan A, Wang S, Labuda D, Robert MF, Sarrazin J, et al. Human mitochondrial HMG CoA synthase: liver cDNA and partial genomic cloning, chromosome mapping to 1p12-p13, and possible role in vertebrate evolution. *Genomics*. 1994;23(3):552-9.
14. Pitt JJ, Peters H, Mishra A, Eggington M, Johnson D, Hinderhofer K, et al. Mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase deficiency may be recognised by increased concentrations of 4-hydroxy-6-methyl-2-pyrone in urinary organic acid analysis [abstract]. *Mol Genet Metab*. 2009;98 (1-2):51.
15. Pitt JJ, Peters H, Boneh A, Yapliito-Lee J, Wieser S, Hinderhofer K, et al. Mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase deficiency: urinary organic acid profiles and expanded spectrum of mutations. *J Inherit Metab Dis*. 2014;38(3):459-66.
16. Wolf NI, Rahman S, Clayton PT, Zschocke J. Mitochondrial HMG-CoA synthase deficiency: identification of two further patients carrying two novel mutations. *Eur J Pediatr*. abril de 2003;162(4):279-80.
17. Hernández M, Teresa ME, López S, Gil S, Santiago FJ, García J, et al. Funcional characterization of 11 missense mutations associated with human mitochondrial HMG-CoA synthase deficiency [abstract]. *J Physiol Biochem*. 2016;72(S1):S110.
18. Bouchard L, Robert MF, Vinarov D, Stanley CA, Thompson GN, Morris A, et al. Mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase deficiency: clinical course and description of causal mutations in two patients. *Pediatr Res*. 2001;49(3):326-31.
19. Aledo R, Mir C, Dalton RN, Turner C, Pié J, Hegardt FG, et al. Refining the diagnosis of mitochondrial HMG-CoA synthase deficiency. *J Inherit Metab Dis*. 2006;29(1):207-11.
20. Sass JO, Kühlwein E, Klauwer D, Rohrbach M, Baumgartner M. Hemodiafiltration in mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase (HMG-CoA synthase) deficiency [abstract]. *J Inherit Metab Dis*. 2013;36(S2):S189.
21. Aledo R, Zschocke J, Pié J, Mir C, Fiesel S, Mayatepek E, et al. Genetic basis of mitochondrial HMG-CoA synthase deficiency. *Hum Genet*. 2001;109(1):19-23.
22. Zschocke J, Penzien JM, Bielen R, Casals N, Aledo R, Pié J, et al. The diagnosis of mitochondrial HMG-CoA synthase deficiency. *J Pediatr*. 2002;140(6):778-80.
23. Nakajima Y, Fukao T, Nakano Y, Sasai H, Aoyama Y, Kato S, et al. First two patients with mitochondrial HMG-CoA synthase deficiency in Asia [abstract]. *J Inherit Metab Dis*. 2015;38(S1):S197.
24. Carpenter K, Bhattacharya K, Ellaway C, Zschocke J, Pitt JJ. Improved sensitivity por HMG-CoA synthase detection using key markers on organic acid screen [abstract]. *J Inherit Metab Dis*. 2010;33(S1):S62.
25. Ramos M, Menao S, Arnedo M, Puisac B, Gil MC, Teresa ME, et al. New case of mitochondrial HMG-CoA synthase deficiency: functional analysis of eight mutations. *Eur J Med Genet*. 2013;56(8):411-5.

26. Loughrey C, Cundick J, Olpin S, Manning N, Cardy D, Zschocke J. Poor outcome in 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) synthase deficiency [abstract]. *J Inherit Metab Dis.* 2013;36(S2):S197.
27. Morris AAM, Lascelles C V, Olpin SE, Lake BD, Leonard J V, Quant PA. Hepatic mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase deficiency. *Pediatr Res.* septiembre de 1998;44(3):392-6.
28. Ramos M. Estudio funcional de la enzima HMG-CoA sintasa mitocondrial humana: nuevo método de expresión y ensayo enzimático [tesis doctoral]. Universidad de Zaragoza; 2009.
29. Pié J, López-Viñas E, Puisac B, Menao S, Pié A, Casale C, et al. Molecular genetics of HMG-CoA lyase deficiency. *Mol Genet Metab.* 2007;92(3):198-209.
30. Martínez M, Gómez L, Ruiz M, Sánchez-Valverde F, Dalmau J. Diagnóstico y tratamiento de las alteraciones de la oxidación mitocondrial de las grasas. En: *Protocolos diagnóstico-terapéuticos de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica.* 2.^a ed. Madrid: Ergón S.A.; 2010. p. 371-8.
31. Hogg S, Pierre G, Buck J, Thalange N, Champion M, Calvin J. 4-hydroxy-6-methyl-2-pyrone and ketonuria in HMG-CoA synthase deficiency [abstract]. *J Inherit Metab Dis.* 2012;35(S1):S60.
32. Carpenter K, Moore E, Bhattacharya K. HMG-CoA synthase deficiency-How common is it and how good are our markers? [abstract]. *Twin Research and Human Genetics.* 2012;15(4):578

ANEXOS

Anexo 1. Pacientes con deficiencia de mHS descritos hasta la fecha en todo el mundo:

PACIENTE	SEXO ¹	GENOTIPO ²	EDAD ³	RESUMEN DE HISTORIA CLÍNICA	REFERENCIA
1	H	F174L/F174L	6 a	Gastroenteritis con pobre ingesta oral, hipoglucemia, hipocetonemia, breve convulsión generalizada, coma superficial	[8]
2	H	R424X/-	1 a y 4 m	Diarrea, vómitos, hipoglucemia, hipocetonemia, hepatomegalia, obnubilación, encefalopatía	[27]
3	H	G212R/R500H	11 m	Gastroenteritis, vómitos, hipoglucemia, hipocetonemia, depresión respiratoria, leve hepatomegalia, coma	[21]
4	M	G212R/IVS5+1G>A	9 m	Gastroenteritis, diarrea, vómitos, hipoglucemia, hipocetonemia, hepatomegalia, coma	[22]
5	M	V54M/Y167C	4 a y 6 m	Gastroenteritis, diarrea, vómitos, colapso circulatorio, hepatomegalia	[16]
6	M	V54M/Y167C	1 a y 7 m	Gastroenteritis, diarrea, vómitos, hepatomegalia	[16]
7	H	R188H/M307T	7 m	Resfriado común con pobre ingesta oral, hipoventilación, hipoglucemia, hipocetonemia, hepatomegalia, encefalopatía	[19]
8	H	R188H/M307T	1 a	Vómitos, letargia	[19]
9	-	Del E1 (hom.)	8 m	Hipoglucemia, hepatomegalia, acidosis metabólica	[14]
10	-	Del E1 (hom.)	9 m	Hipoglucemia, hepatomegalia, acidosis metabólica	[14]
11	-	Del E1 (hom.)	6 m	Hipoglucemia, hepatomegalia, acidosis metabólica	[14]
12	-	Del E1 (hom.)	10 m	Hipoglucemia, hepatomegalia, acidosis metabólica	[14]

Tabla 7.1 Sexo, genotipo, edad de debut y resumen de la historia clínica de los pacientes reportados con deficiencia de mHS

(¹) H: hombre; M: mujer (²) A: años; M: meses (³) Del: delección; Hom: homocigosis

PACIENTE	SEXO ¹	GENOTIPO ²	EDAD ³	RESUMEN DE HISTORIA CLÍNICA	REFERENCIA
13	-	L266S/I407T	3 y 1 m	Hipoglucemia	[14]
14	-	G388R/G388R	6 m	Hipoglucemia, hepatomegalia, acidosis metabólica	[14]
15	-	G388R/G388R	-	-	[14]
16	-	G169D/R505Q	2 y 5 m	Hipoglucemia	[14]
17		G232V/Q283X	8 m	Diarrea, vómitos, acidosis metabólica con anión gap elevado, hipoglucemia, hipocetonemia	[24]
18		--/--	14 m	Síndrome de Sanjad-Sakati, fiebre, vómitos, acidosis metabólica, hipoglucemia	[24]
19	-	--/--	-	Hipoglucemia	[31]
20	-	--/--	-	Hipoglucemia	[31]
21	H	G388R/R424X	15 m	Gastroenteritis, hipoglucemia, hepatomegalia	[25]
22	H	G212R/G212R	10 m	Dificultad respiratoria, acidosis metabólica, hipoglucemia, hepatomegalia, encefalopatía, edema cerebral, muerte	[20]
23	M	G212R/G212R	12 m	Dificultad respiratoria, acidosis metabólica, hipoglucemia, hepatomegalia, encefalopatía	[20]
24	M	W185R/Y503C	13 m	Gastroenteritis por norovirus, hipoglucemia, hipocetonemia, edema cerebral, muerte	[26]

Tabla 7.2 Sexo, genotipo, edad de debut y resumen de la historia clínica de los pacientes reportados con deficiencia de mHS

(¹) H: hombre; M: mujer (²) A: años; M: meses (³) Del: delección; Hom: homocigosis

PACIENTE	SEXO ¹	GENOTIPO ²	EDAD ³	RESUMEN DE HISTORIA CLÍNICA	REFERENCIA
25	M	S392L/R500H	8 m	Ayuno por pérdida de apetito, vómitos, dificultad respiratoria, hipoglucemia, hipocetonemia, hepatomegalia, acidosis metabólica	[23]
26	H	G219E/R500C	6 m	Gastroenteritis, dificultad respiratoria, coma hipoglucémico, hipocetonemia, hepatomegalia, acidosis metabólica	[23]
27	-	Del E1 (hom.)	1 a	Hipoglucemia, daño cerebral, coma	[15]
28	-	G212R/V144fs	-	Hipoglucemia, hipocetonemia, acidosis metabólica, coma	[15]
29	-	G232V/Q283X	-	Hipoglucemia, hipocetonemia, acidosis metabólica, coma	[15]
30	-	W185R/Y503C	-	Hipoglucemia, hipocetonemia, acidosis metabólica, coma	[15]
31	-	S360P/S360P	-	Hipoglucemia, hipocetonemia, acidosis metabólica, coma	[15]
32	-	G168S/F174L	-	Hipoglucemia, hipocetonemia, acidosis metabólica, coma	[15]
33	H	R112W/--	3 m	Crisis febril, vómitos, hipoglucemia, hipocetonemia	[17]
34	H	V144L/V144L	-	Hipoglucemia	[17]
35	M	R501Q/M146R	6 m	Vómitos, somnolencia, dificultad respiratoria, hepatomegalia severa, acidosis metabólica	[17]

Tabla 7.3 Sexo, genotipo, edad de debut y resumen de la historia clínica de los pacientes reportados con deficiencia de mHS

(¹) H: hombre; M: mujer (²) A: años; M: meses (³) Del: delección; Hom: homocigosis

Anexo 2. Protocolos utilizados:

2.1 Transformación de XL1-Blue:

1. Sacar una alícuota de células competentes XL1-Blue guardadas a -80°C y dejar en hielo hasta su descongelación.
2. Mezclar en un tubo de polipropileno, especial para transformación, $35\mu\text{l}$ de células competentes XL1-Blue y $5\mu\text{l}$ de producto de PCR.
3. Incubar 30 minutos en hielo.
4. Choque térmico: calentar la mezcla de reacción a 42°C durante 45 segundos en un baño de agua y seguidamente trasvasarla a hielo durante 2 minutos.
5. Añadir $300\mu\text{l}$ de medio de cultivo SOB atemperado y estéril (ver punto 7.2.2).
6. Incubar a 37°C y 150rpm durante 2 horas. *En esta fase todas aquellas células que hayan sido transformadas expresarán el gen de resistencia a ampicilina presente en el DNA plasmídico.*
7. Sembrar el volumen total de la mezcla anterior en una placa atemperada con medio LB-ampicilina sólido (ver punto 7.2.3).
8. Dejar crecer el medio durante 24 horas a 37°C .

2.2 Medios de cultivo - Medio SOB (Super Optimal Broth):

Este medio es mucho más rico en nutrientes que el medio LB (Luria-Bertani). Se usará cuando se requiera un rápido crecimiento bacteriano.

1. Disolver 30,7 gramos de medio SOB de Pronadisa (ver tabla 7.4) en 1 litro de agua destilada. Calentar y agitar hasta completa disolución.
2. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
3. Conservar a 4°C .

Reactivos	Cantidad
Triptona	20g
Extracto de levadura	5g
NaCl	0,5g
KCl	0,186g
MgSO ₄	5g
Agua destilada	c.s.p. 1l

Tabla 7.4 Composición del medio SOB

2.3 Medios de cultivo - Medio LB (Luria-Bertani):

a. Medio LB líquido:

1. Disolver 20 gramos de LB (Lenox-Pronadisa) en 1 litro de agua destilada (ver tabla 7.5). Calentar y agitar hasta su completa disolución.
2. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
3. Conservar a 4°C.

Reactivos	Cantidad
Triptona	10g
Extracto de levadura	5g
NaCl	5g
Agua destilada	c.s.p. 1l

Tabla 7.5 Composición de medio LB líquido

b. Medio LB sólido:

1. Disolver 35 gramos de LB-AGAR (Lenox-Pronadisa) en 1 litro de agua destilada (ver tabla 7.6). Calentar y agitar hasta su completa disolución.
2. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
3. Cuando el medio esté atemperado, añadir el antibiótico ampicilina a una concentración final de 1:1000.
4. Añadir la solución a las placas de cultivo. Una vez solidificadas, conservar a 4°C hasta su uso.

Reactivos	Cantidad
Triptona	10g
Extracto de levadura	5g
NaCl	5g
Agar bacteriológico	15g
Agua destilada	c.s.p. 1l

Tabla 7.6 Composición de medio LB sólido

2.4 “Miniprep”:

1. Bajar el cultivo celular. Añadir a un tubo Eppendorf 1,5ml de cultivo. Centrifugar 1 minuto a 13000 rpm y a temperatura ambiente. Eliminar el sobrenadante y repetir el proceso sobre el mismo tubo Eppendorf.
2. Resuspender el pellet con 250µl de disolución de resuspensión.
3. Añadir 250µl de disolución de lisis y mezclar por inversión 4-5 veces. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Añadir 350µl de solución neutralizadora e invertir 4-6 veces. Centrifugar 5 minutos a 13000 rpm.
5. Sobre la columna de separación añadir el sobrenadante y centrifugar 1 minuto a 13000 rpm. Eliminar el eluido.
6. Añadir sobre la columna 500µl de solución de lavado. Centrifugar 1 min a 13000 rpm. Descartar el eluido. *Repetir el procedimiento 3 veces.*
7. Introducir la columna en un tubo Eppendorf limpio. Añadir 30µl de agua mili-Q, dejar actuar durante 2 minutos y centrifugar 2 minutos a 13000rpm para eluir el DNA plasmídico.

2.5 Mezcla de la reacción de secuenciación:

1. Medir la concentración de DNA plasmídico por espectrofotometría aprovechando la propiedad de absorbancia del DNA de doble cadena a 260nm.
2. Añadir en un tubo Eppendorf la cantidad suficiente de DNA para alcanzar 250ng en disolución aproximadamente.
3. Añadir 3,5µl del primer de secuenciación a una concentración de 1ng/µl (ver tabla 7.7).
4. Ajustar el volumen final con agua mili-Q hasta alcanzar los 19µl.

primers	Secuencia 5'.....3'
mHS_SE3	AGGATTCAGGCAATACTG
mHS_SR3	CCTCGCTCCAGGGCCAG
mHS_SE5	ACATGATCTTTCATACACC

Tabla 7.7 Primers secuenciación DNA plasmídico*.

*Cada una de las colonias se secuenciarán con este trío de primers.

2.6 Inducción de la expresión:

1. Preparación del preinóculo: sobre 25ml de medio LB-ampicilina líquido (ver punto 2.3), picar una de las colonias de la cepa BL21 con el inserto. Incubar a 37°C durante 12 horas en agitación en un shaker a 150 rpm.

2. Trasvasar el preinóculo a 1 litro de LB-ampicilina y dejar crecer, durante 3 horas aproximadamente, hasta que la DO_{595nm} alcance 0,8-1,2.
3. Bajar la temperatura de incubación a 20°C.
4. Dejar pasar 20 minutos para que se atempere el medio e inducir la expresión añadiendo IPTG hasta una concentración final de 0,3mM.
5. Dejar en agitación a 150 rpm durante 18 horas a 20°C.
6. Centrifugar el cultivo 10 minutos a 4°C a 4000 rpm y recuperar el pellet.

2.7 Lisis celular:

1. Resuspender el pellet obtenido tras la inducción en 4ml de buffer de lisis (ver tabla 7.8).
2. Incubar a 37°C durante 15 minutos, invirtiendo cada 2-3 minutos.
3. Incubar inmediatamente a -80°C durante 45 minutos.
4. Descongelar el lisado a 37°C durante 2-3 minutos aproximadamente.
5. Centrifugar a 13000rpm durante 30 minutos a 4°C.
6. Recuperar el sobrenadante. *Es la fase donde se van a encontrar todas las proteínas solubles, entre ellas nuestra proteína recombinante.*

Reactivos	Concentración
Tris-base pH 7,4	20mM
NaCl	200mM
EDTA	1mM
Lisozima	1mg/ml
DNAsa	10µg/ml
RNAsa	10µg/ml
PMSF (inhibidor proteasas)	100µg/ml
DTT	1mM
Glicerol	10%(v/v)
Tritón X-100	0,2%(v/v)

Tabla 7.8 Composición del buffer de lisis

2.8 Purificación y corte de la proteína de fusión:

1. Equilibrado de las bolas de resina con amilosa (#800-21S de New England Biolabs). Estas vienen reconstituidas en un 20% de alcohol, que hay que eliminar:
 - a. Tomar una cantidad determinada de bolas en un tubo Eppendorf y centrifugar 5 minutos a 4000 rpm. Eliminar el sobrenadante.
 - b. Rellenar el tubo con Column Buffer (ver tabla 7.9) y agitar la mezcla por inversión. Centrifugar 5 minutos a 4000 rpm y eliminar el sobrenadante. *Repetir este paso dos veces.*
 - c. Añadir la cantidad necesaria de Column Buffer para dejar las bolas de amilosa al 50% de concentración.
2. Añadir 100µl de la disolución anterior por cada mililitro de disolución de lisado e incubar la mezcla de proteínas y amilosa durante 1 hora a 4°C con agitación suave.
3. Centrifugar a 4000rpm durante 5 minutos y seguidamente, eliminar el sobrenadante.
4. Resuspender el pellet en 1ml de Column Buffer.
5. Trasvasar la disolución a una columna cromatográfica (“Poly-Prep® Chromatography column” de Bio-Rad) y eluir el tampón sin dejar que la columna se seque del todo.
6. Lavar con 6ml de Column Buffer y eluir el tampón. *Repetir el proceso 3 veces. Todos estos pasos se realizarán a 4°C.*
7. Recoger de la columna las bolas de amilosa unidas a la proteína de fusión y centrifugar 1 minuto a 4000rpm y 4°C. Eliminar el sobrenadante.
8. Resuspender el precipitado en 250µl de Buffer de proteasa (ver tabla 7.10) y añadir Factor Xa hasta una concentración de 0,1% (v/v).
9. Incubar durante 24 horas con agitación suave a 4°C.
10. Centrifugar 1 minuto a 4000rpm y 4°C. Recuperar el sobrenadante y conservar a -80°C.

Reactivos	Concentración
Tris-base pH 7,4	20mM
NaCl	200mM
EDTA	1mM

Tabla 7.9 Composición del Column Buffer

Reactivos	Cantidad
Tris (pH 8)	20mM
NaCl	150mM
EDTA	1mM
DTT	1mM
Glicerol	10%(v/v)
Factor Xa	0,1%(v/v)

Tabla 7.10 Composición del buffer de proteasa

2.9 Electroforesis SDS-PAGE:

1. Montar el sistema de electroforesis con el gel y el tampón de electroforesis (1x Tris/glicina/SDS de Bio-Rad).
2. Cargar en cada uno de los pocillos las muestras previamente tratadas y el marcador de pesos moleculares.
3. Correr el gel con un voltaje de 150V durante aproximadamente 1 hora.

2.10 Western Blot:

1. Activar la membrana de PVDF Immobilon-P (Millipore) sumergiéndola en una disolución de metanol durante 30 segundos, 1 minuto en agua destilada y por último equilibrar en el tampón de transferencia (1x Tris/glicina/metanol de Bio-Rad).
2. Retirar el gel de poliacrilamida y equilibrarlo en el tampón de transferencia.
3. Montar el sistema de transferencia según el siguiente orden:
 - a. Esponja
 - b. Papel Whatman 3M
 - c. Gel de poliacrilamida
 - d. Membrana de nitrocelulosa (Immobilon-P, Millipore)
 - e. Papel Whatman 3M
 - f. Esponja
4. Eliminar las burbujas de aire que hayan podido quedar atrapadas entre el gel y la membrana.
5. Colocar el sistema de transferencia en la cubeta de transferencia. El gel en el polo negativo (negro) y la membrana en el polo positivo (rojo). La cubeta ha de estar refrigerada a 4°C.
6. Realizar la transferencia durante 90 minutos a una intensidad de 300mA.

7. Finalizada la transferencia, retirar la membrana y lavarla durante 10 minutos con TBS-Tween (ver tabla 7.11) y agitación. *Repetir este paso dos veces.*
8. Teñir la membrana con Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R-250 de Sigma) al 1% disuelto en ácido acético: metanol: agua (1:8:20) durante una hora.
9. Desteñir mediante una solución decolorante con la siguiente composición: ácido acético: metanol: agua (1:8:20).
10. Bloquear la membrana con una disolución de TBS-Tween-Leche en polvo al 5% (ver tabla 7.11) durante 1 hora.
11. Lavar la membrana durante 10 minutos con TBS-Tween con agitación. *Repetir este paso dos veces.*
12. Incubar la membrana con el anticuerpo primario específico contra la proteína mHS diluido 1:500 en TBS-Tween-Leche toda la noche a 4°C.
13. Lavar con TBS-Tween dos veces durante 10 minutos con agitación.
14. Incubar la membrana con el anticuerpo secundario diluido 1:1000 en TBS-Tween-Leche durante 2 horas a temperatura ambiente. Tapar el sistema para evitar que incida la luz sobre él.
15. Lavar con TBS-Tween dos veces durante 10 minutos con agitación. Revelar la membrana con el reactivo “EMD Millipore Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate” (ECL) de Millipore, con exposiciones cada 5 minutos durante 40 minutos.

Reactivos	Cantidad
NaCl	8g
KCl	0,2g
TRIS	3g
Tween	1ml
Leche en polvo*	50g
Agua c.s.p	1000ml

Tabla 7.11 Composición del buffer de la solución TBS-Tween

*Este reactivo se añadirá tan sólo en la solución TBS-T-Leche

Anexo 3: Abreviaturas

'	Minuto
”	Segundo
10x	10 veces concentrado
4-HMP	4-hidroxi-6-metil-2-pirona
A	Adenina
Å	Ångström
ASO	<i>Allele Specific Oligonucleotide</i>
BSA	Albúmina de suero bovino
C	Citosina
c.s.p.	Cantidad suficiente para
cDNA	DNA codificante
chs	HMG-CoA sintasa citosólica humana
cm	Centímetro
cm	Centímetro
CPT1	Carnitina Palmitoiltransferasa I
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAsa	Desoxirribonucleasa
dNTPs	Desoxirribonucleótidos
DO_{595nm}	Densidad óptica a 595 nanómetros
DTT	Ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECG	Electrocardiograma
EDTA	Etilendiaminotetraacetato
F	<i>Forward</i>
G	Guanina
g	Gramo
GH	Hormona del crecimiento
GLUT-1	Transportador de glucosa 1
GLUT-3	Transportador de glucosa 3
HL	HMG-CoA liasa
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA
<i>HMGCS1</i>	Gen de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa citosólica
<i>HMGCS2</i>	Gen de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa mitocondrial
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
KCl	Cloruro de potasio
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramo

MBP	Proteína de unión a la maltosa
MCAD	Deficiencia de acil CoA-deshidrogenasa de cadena media
mg	Miligramo
MgCl₂	Cloruro de magnesio
mHS	HMG-CoA sintasa mitocondrial humana
MIM#	Referencia para una enfermedad
MIM*	Referencia para un gen
min	Minuto
ml	Mililitro
MLPA	<i>Multiplex Ligation Probe Analysis</i>
mM	Milimolar
NaCl	Cloruro de magnesio
ng	Nanogramo
NM	Secuencia de referencia del gen
nm	Nanómetro
NP	Secuencia de referencia de la proteína
°C	Grado centígrado
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonio
R	<i>Reverse</i>
RNAse	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
SCOT	Succinil-CoA acetoacetato transferasa
SDS	Dodecilsulfato sódico
T	Timina
TRIS	2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
WT	Wild type
ΔAbs	Incremento de absorbancias
ε	Coeficiente de extinción molar
μg	Microgramo
μl	Microlitro
μM	Micromolar
μmol	Micromol

Anexo 4: Lista de aminoácidos

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