

María Arnedo Muñoz

Caracterización subcelular y por tejidos de la isoenzima HMG-COA Liasa Like 1

Departamento
Farmacología y Fisiología

Director/es
Pie Juste, Juan
Puisac Uriol, Beatriz

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

CARACTERIZACIÓN SUBCELULAR Y POR TEJIDOS DE LA ISOENZIMA HMG-COA LIASA LIKE 1

Autor

María Arnedo Muñoz

Director/es

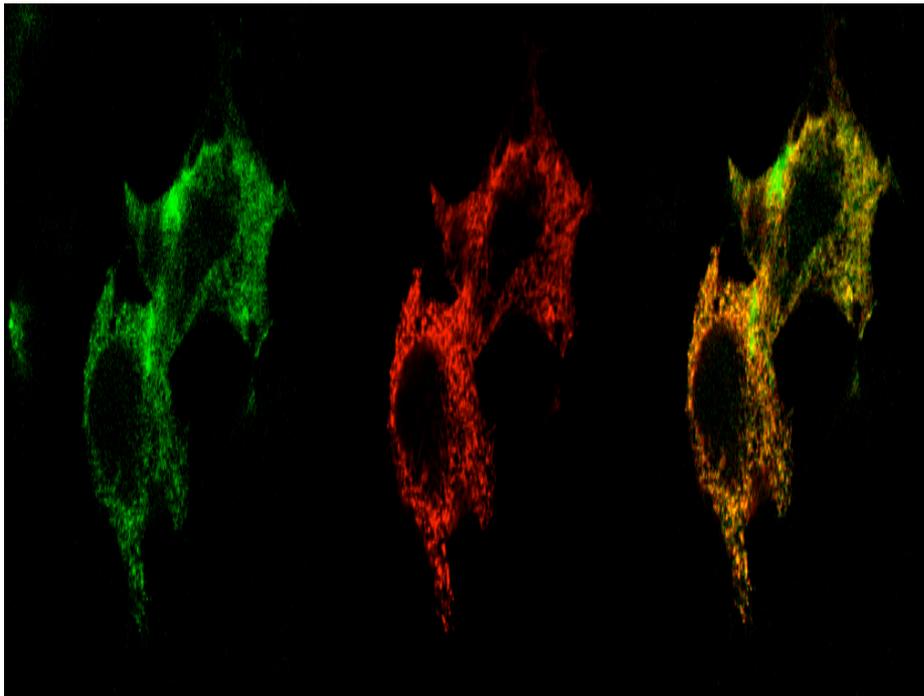
Pie Juste, Juan
Puisac Uriol, Beatriz

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Farmacología y Fisiología

2011

CARACTERIZACIÓN SUBCELULAR Y POR TEJIDOS DE LA ISOENZIMA HMG-CoA LIASA LIKE 1



**MARÍA ARNEDO MUÑOZ
TESIS DOCTORAL
2011**

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



**CARACTERIZACIÓN SUBCELULAR Y POR
TEJIDOS DE LA ISOENZIMA HMG-CoA
LIASA LIKE 1**

Memoria presentada por:

**Dña. María Arnedo Muñoz
para aspirar al Título de
Doctor**

JUAN PIE JUSTE, PROFESOR TITULAR DE FISIOLÓGÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

DECLARA:

Que la memoria presentada por Dña. María Arnedo Muñoz, con el título "Caracterización subcelular y por tejidos de la isoenzima HMG-CoA Liasa Like1", corresponde a un trabajo realizado bajo mi dirección en la Unidad de Genética Clínica y Genómica Funcional del Departamento de Farmacología y Fisiología. Terminada en esta fecha y revisado su contenido, estimo reúne las condiciones requeridas para optar al Título de Doctor.

Zaragoza, 27 de Octubre de 2011

Fdo: Juan Pié Juste

BEATRIZ PUISAC URIOL, PROFESORA AYUDANTE DOCTOR DE FISIOLÓGÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

DECLARA:

Que la memoria presentada por Dña. María Arnedo Muñoz, con el título "Caracterización subcelular y por tejidos de la isoenzima HMG-CoA Liasa Like1", corresponde a un trabajo realizado bajo mi dirección en la Unidad de Genética Clínica y Genómica Funcional del Departamento de Farmacología y Fisiología. Terminada en esta fecha y revisado su contenido, estimo reúne las condiciones requeridas para optar al Título de Doctor.

Zaragoza, 27 de Octubre de 2011

Fdo: Beatriz Puisac Uriol

Esta Tesis Doctoral se ha podido realizar gracias al apoyo económico prestado por la Diputación General de Aragón y la Universidad de Zaragoza en forma de:

Reconocimiento de Grupo Consolidado de Investigación de Aragón dado a "Genética Clínica y Genómica Funcional" y dirigido por D. Juan Pié Juste, durante los trienios 2005-2007 y 2008-2010. (Código: B20. Diputación General de Aragón).

Proyecto de Investigación "Caracterización cinética y localización subcelular de la enzima HMG-CoA Liasa Like1", dado a D. Juan Pié Juste, durante los años 2009-2010. (Código: PI128/08. Diputación General de Aragón).

Proyecto de Investigación "Caracterización del nivel de expresión y de actividad de la isoenzima HL-Like1 en tejidos humanos", dado a D. Juan Pié Juste, durante el año 2010. (Código: UZ2009-BIO-04. Universidad de Zaragoza).

Zaragoza, 27 de Octubre de 2011

Fdo: Juan Pié Juste

“Creo que al final del camino no te premiarán por lo que encuentres,
sino por aquello que hayas buscado honestamente”

Anónimo

A mis padres,
porque sin su apoyo
ahora no estaría aquí

AGRADECIMIENTOS

Después de más de seis años de trabajo son muchas las personas a las que tengo que agradecer su apoyo, ayuda, comprensión y sobre todo paciencia para poder llegar al final de este camino.

En primer lugar, le agradezco a mi Director de Tesis, el Prof. Juan Pié Juste, la oportunidad que me dio al acogerme en su grupo para realizar este trabajo así como su continuo apoyo.

A Beatriz Puisac, por ser mi "mami científica", por estar a mi lado en todo momento, por sus continuos consejos, su apoyo y por seguir creyendo en mí cuando había tirado la toalla.

A lo largo de este tiempo he tenido la gran suerte de conocer a personas que me han aportado sus conocimientos con generosidad como han sido:

El Dr. César Casale y todo su grupo en Río Cuarto, Argentina. Por hacerme sentir como en casa, a pesar de los 10000 km de distancia, y por enseñarme otra manera de ver y vivir la ciencia.

A la Dra. Núria Casals, por sus consejos a la hora de seguir con mi trabajo y por el apoyo que me ha brindado durante todo este tiempo.

Al Prof. Fausto García Hegardt, por ser una inspiración y un modelo a seguir para todos nosotros.

Por supuesto tengo mucho que agradecer a todas las personas que durante estos años han trabajado conmigo y me han enseñado, ayudado y apoyado durante este viaje que ha sido para mí la realización de la tesis.

A Conchi, por todo, si tengo que enumerar todo lo que te tengo que agradecer no termino nunca. Por toda tu ayuda, moral y "de poyata", la paciencia que has tenido siempre conmigo, tus consejos... He tenido mucha suerte de tenerte a mi lado durante todos estos años, como compañera pero sobre todo como amiga.

A Rebe y a Espe, por los buenos momentos que hemos pasado en el laboratorio y que han hecho más llevadero y alegre todo este tiempo.

A Sebas, por su apoyo al comienzo de este camino.

A todas las personas que han pasado por nuestro grupo a lo largo de estos años y que me han enseñado más cosas de las que pueden imaginar, a Mapi, Mónica, Jesús, Milagros y Juan Carlos.

A todos los becarios y miembros de los distintos grupos con los que he tenido la suerte de colaborar estos años, especialmente a Alexis y Esther, por permitirme haber sido "su sombra" y por la paciencia y ayuda que me brindaron cuando trabajé con ellos.

Y por último a todos los compañeros del departamento de "Fisio", con los que he compartido muy buenos momentos, a Laura, Carmen, Pilar, Álvaro, Edu, Lorena, César y Marta.

Y finalmente, tengo mucho que agradecer a mi familia y amigos por el apoyo y la ayuda recibida.

A mis padres, por creer siempre en mí y en que era capaz de realizar esta tesis. Por su apoyo constante e incondicional, si ahora estoy aquí es gracias a vosotros.

A mi hermano Diego y a Ana, por estar a mi lado en todo momento.

A mi abuela, por preocuparse siempre por mí y porque su único deseo es verme feliz.

A todos mis tíos y primos. Muchas gracias por vuestro apoyo y por interesaros siempre por mi trabajo.

A todos mis amigos, de Grávalos y Zaragoza. Porque a pesar de las caras tan raras que ponéis cuando os intento explicar lo que hago en el laboratorio, sé que sabéis lo importante que es para mí y siempre he podido contar con vosotros en los momentos de bajón.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Vías de la cetogénesis	4
1.1.1. La cetogénesis durante el desarrollo	7
1.2. Funciones de los cuerpos cetónicos	9
1.2.1. Fuente de energía	10
1.2.2. Síntesis lipídica	11
1.2.3. Antioxidante	11
1.2.4. Neuroprotección	12
1.2.5. Activación de la salida de insulina	14
1.3. Las isoenzimas HMG-CoA Liasa mitocondrial y peroxisomal	15
1.3.1. El gen <i>HMGCL</i>	16
1.4. La nueva enzima HMG-CoA Liasa-Like 1	16
1.4.1. Características del gen <i>HMGCLL1</i>	17
1.4.2. Comparación de los genes <i>HMGCL</i> y <i>HMGCLL1</i>	17
1.4.3. Comparación de las proteínas HL y HL-Like1	18
1.5. La tubulina	19
1.5.1. Función de la tubulina acetilada	20

1.5.2. Posible relación entre la tubulina acetilada y la HL-Like1	21
2. OBJETIVOS	23
3. MATERIAL Y MÉTODOS	25
MATERIAL	27
3.1. Muestras biológicas analizadas	29
3.1.1. Paneles comerciales de cDNA	27
3.1.2. Cultivos celulares	28
3.1.3. Tejidos humanos	28
3.2. Mutaciones caracterizadas en pacientes con deficiencia de HL	29
MÉTODOS	30
3.3. Comprobación de la homología estructural entre las enzimas HL-Like1 y HL	30
3.3.1. Obtención de un modelo bioinformático para la HL-Like1	30
3.3.2. Introducción de mutaciones homólogas de la HL en la HL-Like1 en el modelo propuesto	31
3.3.3. Mutagénesis dirigida	31
3.3.3.1. PCR de la mutagénesis dirigida	32
3.3.3.2. Digestión con DpnI	34
3.3.3.3. Transformación de los plásmidos mutados en <i>E. coli</i>	34
3.3.3.3.1. Cepas bacterianas	34
3.3.3.3.2. Medios líquidos	35
3.3.3.3.3. Medios sólidos	36
3.3.3.3.4. Preparación de células competentes	36
3.3.3.4. Selección de las colonias positivas	37
3.3.3.4.1. PCR boiling	38
3.3.3.4.2. Electroforesis de los ácidos nucleicos en geles de agarosa	39
3.3.3.4.3. Aislamiento de DNA plasmídico	39
3.3.3.4.4. Secuenciación	40

3.3.4. Expresión de las proteínas nativas y mutadas HL-Like1 y HL	41
3.3.4.1. Inducción de la expresión	41
3.3.4.2. Ruptura celular	42
3.3.4.3. Purificación de la proteína	42
3.3.4.4. Corte de la proteína de fusión	43
3.3.5. Métodos de estudio de las proteínas HL-Like1 y HL expresadas en <i>E. coli</i>	44
3.3.5.1. Cuantificación de proteínas. Método de Bradford	44
3.3.5.2. Electroforesis discontinua en geles SDS-poliacrilamida	45
3.3.5.3. Detección inmunológica de proteínas por inmunotransferencia	46
3.3.6. Medidas de la actividad liasa	48
3.3.6.1. Reacción acoplada de escisión del HMG-CoA en acetoacetato y en acetil-CoA y transformación de acetoacetato en β -hidroxibutirato	49
3.4. Localización de variantes de <i>splicing</i> del gen <i>HMGCLL1</i>	50
3.4.1. Búsqueda de variantes de <i>splicing</i> mediante métodos bioinformáticos	51
3.4.1.1. Bases de datos de ESTs	51
3.4.1.2. Base de datos de cDNAs completos	51
3.4.1.3. Búsqueda de homologías de secuencia de DNA	52
3.4.1.4. Base de datos de proteínas	52
3.4.1.5. Cálculo del grado de fortaleza de las secuencias donadoras yceptoras de <i>splicing</i>	53
3.4.2. Búsqueda de variantes de <i>splicing</i> por amplificación de fragmentos solapantes	53
3.4.2.1. Diseño de primers	53
3.4.2.2. Purificación del producto de PCR	56
3.4.2.2.1. Purificación en columna	56
3.4.2.2.2. Purificación enzimática	56
3.4.2.2.3. Purificación en gel	57

3.4.2.2.4. Secuenciación	58
3.4.2.2.5. Secuenciación mediante clonaje de las variantes de <i>splicing</i> en el plásmido PCR®2.1-TOPO	58
3.5. Localización subcelular de las proteínas HL-Like1 y HL	58
3.5.1. Clonación del cDNA de los genes <i>HMGCLL1</i> y <i>HMGCL</i> en el plásmido PCR®2.1-TOPO	58
3.5.1.1. Vectores de expresión	59
3.5.1.2. Creación de los insertos	59
3.5.1.2.1. Amplificación del cDNA del <i>HMGCLL1</i>	60
3.5.1.2.2. Amplificación del cDNA del <i>HMGCL</i>	60
3.5.1.3. Ligación del plásmido pCR®2.1-TOPO con el inserto	61
3.5.1.4. Transformación de los vectores recombinantes HMGCLL1-pCR®2.1-TOPO y HMGCLpCR®2.1-TOPO en <i>E. coli</i> XL1 blue	61
3.5.1.5. Selección de las colonias positivas	62
3.5.2. Subclonaje de los genes <i>HMGCLL1</i> y <i>HMGCL</i> en vectores de localización subcelular eucariota	62
3.5.2.1. Vectores de clonaje	62
3.5.2.2. Digestión de los vectores recombinantes HMGCLL1pCR®2.1-TOPO y HMGCL-pCR®2.1-TOPO y del plásmido final de clonaje	64
3.5.2.3. Purificación del inserto	64
3.5.2.4. Ligación del vector e inserto digeridos	64
3.5.3. Cultivo de células eucariotas HEK293	65
3.5.3.1. Tratamiento de los cover-slips (cs)	65
3.5.4. Transfección de las células eucariotas con los vectores recombinantes	66
3.5.5. Fijación de las células a los cover-slips	67
3.5.6. Inmunolocalización del peroxisoma en células transfectadas con el vector recombinante HMGCLL1-pEGFP	67

3.5.7. Visualización al microscopio confocal de fluorescencia	69
3.5.8. Estudios de asociación-disociación de la proteína HL-Like1 a la membrana del retículo endoplasmático	69
3.5.8.1. Fraccionamiento subcelular	69
3.5.8.2. Asociación de la proteína HL-Like1 a la membrana de retículo	70
3.5.8.3. Disociación de la membrana	71
3.6. Estudio comparativo de las enzimas HL-Like1 y HL	72
3.6.1. Caracterización de las constantes cinéticas de las enzimas HL-Like1 y HL	72
3.6.1.1. Medidas de actividad de las proteínas HL-Like1 y HL clonadas	72
3.6.1.2. Medidas de actividad liasa en las fracciones citosólica y mitocondrial de testículo humano adulto	73
3.6.2. Sobreexpresión de las enzimas HL-Like1 y HL en cultivos celulares y medición de su actividad	73
3.6.2.1. Clonaje de las proteínas HL-Like1 y HL en un vector de expresión eucariota	73
3.6.2.1.1. Vectores de expresión	74
3.6.2.1.2. Creación de los insertos	74
3.6.2.2. Transfección de los plásmidos recombinantes en un cultivo eucariota	75
3.6.2.3. Lisis y fraccionamiento subcelular de los cultivos eucariotas	75
3.6.2.4. Medidas de actividad	76
3.6.3. Medidas de actividad liasa en tejidos humanos.	76
3.6.3.1. Fraccionamiento subcelular	76
3.6.3.2. Medidas de actividad	76
3.7. Obtención de un anticuerpo específico contra la proteína HL-Like1	76
3.7.1. Selección de la secuencia inmunogénica	77

3.7.2. Obtención del péptido a inmunizar	77
3.7.3. Inmunización de los conejos	77
3.7.4. Purificación de los anticuerpos	78
3.7.5. Comprobación de la especificidad del anticuerpo	78
3.7.5.1. Comprobación del uso del anticuerpo con la proteína HL-Like1 clonada	78
3.7.5.2. Comprobación del uso del anticuerpo sobre cultivos celulares	79
3.7.6. Nivel de expresión de la proteína HL-Like1 en tejidos humanos	79
3.7.6.1. Western-blot sobre una membrana comercial de tejidos adultos humanos	79
3.7.6.2. Western-blot sobre un homogenado de tejidos fetales humanos	79
3.8. Estudio de la interacción de las proteínas HL-Like1 y tubulina	80
3.8.1. Obtención y purificación de tubulina a partir de cerebro de rata	80
3.8.1.1. Obtención de tubulina acetilada	80
3.8.1.2. Preparación de la columna de fosfocelulosa	81
3.8.1.3. Purificación de la tubulina	82
3.8.2. Inmunoprecipitación de los complejos HL-Like1-Tubulina y HL-Tubulina	82
3.8.2.1. Preparación de la sepharosa	82
3.8.2.2. Diálisis del anticuerpo	82
3.8.2.3. Unión de la sepharosa con el anticuerpo dializado	83
3.8.2.4. Inmunoprecipitación del complejo	83
3.8.3. Clonación de las proteínas HL-Like1 y HL con y sin su hélice α-12 y estudio de su interacción con la tubulina	84
3.8.3.1. Vectores de expresión	84
3.8.3.2. Creación de los insertos	85

3.8.3.3.	Obtención de las enzimas HL-Like1 y HL sin su hélice α -12	86
3.8.3.4.	Influencia de la tubulina en la actividad de las enzimas HL-Like1 y HL	86
4.	RESULTADOS	87
4.1.	Comprobación de la homología estructural entre las proteínas HL-Like1 y HL	89
4.1.1.	Modelo tridimensional de la HL-Like1	89
4.1.2.	Mutagénesis dirigida para confirmar la homología estructural de las proteínas HL-Like1 y HL	91
4.1.2.1.	R56Q	91
4.1.2.2.	L207S	92
4.1.2.3.	H248R	92
4.1.3.	Expresión de las proteínas mutadas para el estudio de actividad	92
4.1.4.	Medidas de actividad de las proteínas mutadas	93
4.1.5.	Localización de las mutaciones de la HL-Like1 en la estructura 3D de la enzima	94
4.1.5.1.	Variante R56Q	94
4.1.5.2.	Variante L207S	94
4.1.5.3.	Variante H248R	96
4.2.	Localización de las variantes de <i>splicing</i> fisiológicas del gen <i>HMGCLL1</i>	96
4.2.1.	Análisis de las bases de datos de transcritos completos y de proteínas	96
4.2.1.1.	Base de datos NCBI-Gene	97
4.2.1.2.	Base de datos Ensembl	97
4.2.1.3.	Base de datos UniProt	97
4.2.2.	Análisis de las bases de datos de ESTs	100
4.2.3.	Amplificación de fragmentos solapantes del cDNA del gen <i>HMGCLL1</i>	106
4.2.4.	Secuenciación mediante clonaje en el plásmido PCR2.1-TOPO de las variantes de <i>splicing</i>	110

4.2.5. Grado de fortaleza de las secuencias donadoras y aceptoras de <i>splicing</i>	112
4.3. Localización subcelular de la proteína HL-Like1 en cultivos celulares	113
4.3.1. Clonación de las proteínas HL-Like1 y HL	114
4.3.2. Transfección en células eucariotas de los vectores recombinantes	116
4.4. Interacción de la proteína HL-Like1 con la membrana del retículo endoplasmático	118
4.4.1. Asociación de la proteína HL-Like1 a la membrana del retículo endoplasmático	118
4.4.2. Disociación de la proteína HL-Like1 de la membrana del retículo endoplasmático	119
4.5. Estudio comparativo de las enzimas HL-Like1 y HL	120
4.5.1. Ensayo de actividad de las proteínas HL-Like1 y HL clonadas	120
4.5.1.1. Actividad liasa de las proteínas HL-Like1 y HL clonadas y comparación con la de diferentes fracciones subcelulares	120
4.5.1.2. Actividad liasa de la proteína HL-Like1 del6	123
4.5.2. Ensayo de actividad liasa sobreexpresada en cultivos celulares	124
4.5.2.1. Clonaje de las enzimas HL-Like1 y HL en el vector pIRES2	124
4.5.2.2. Actividad en cultivos eucariotas	125
4.5.2.3. Actividad de la proteína HL-Like1 del6 en cultivos eucariotas	126
4.5.3. Ensayo de actividad liasa en distintas fracciones subcelulares de tejidos humanos	128
4.5.3.1. Actividad liasa en la fracción citosólica de distintos tejidos humanos	128
4.5.3.2. Actividad liasa en la fracción mitocondrial de distintos tejidos humanos	129
4.6. Desarrollo de anticuerpos específicos contra la proteína HL-Like1	131

4.6.1. Obtención del anticuerpo anti-HL-Like1	131
4.6.2. Estudio de la especificidad del anticuerpo anti-HL-Like1	133
4.6.2.1. Comprobación con la proteína HL-Like1 clonada	133
4.6.2.2. Inmunofluorescencia sobre cultivos HEK293 para visualizar la proteína HL-Like1 endógena	134
4.7. Localización por tejidos de las proteínas HL-Like1 y HL	135
4.7.1. Localización de la proteína HL-Like1 en diferentes fracciones subcelulares de distintos tejidos humanos adultos	135
4.7.2. Localización de la proteína HL-Like1 en distintos tejidos humanos fetales	136
4.7.3. Localización de la proteína HL en distintos tejidos humanos adultos	136
4.7.4. Localización de la proteína HL en distintos tejidos humanos fetales	137
4.8. Estudio de interacción de las proteínas HL-Like1 y tubulina	137
4.8.1. Coimmunoprecipitación de la HL-Like1 y la tubulina	137
4.8.2. Clonación y expresión de las proteínas HL y HL-Like1 sin la hélice alfa 12	139
4.8.2.1. Clonaje de las proteínas HL-Like1 y HL sin la hélice α -12	139
4.8.2.2. Expresión y purificación de la proteína HL-Like1 sin péptido líder sin hélice α -12	140
4.8.2.3. Expresión y purificación de la proteína HL-Like1 con péptido líder sin hélice α -12	141
4.8.2.4. Expresión y purificación de la proteína HL sin péptido líder ni hélice α -12	141
4.8.3. Estudios de activación de las proteínas HL-Like1 y HL por parte de la tubulina	142
5. DISCUSIÓN	145

5.1. Homología estructural entre las proteínas HL-Like1 y HL	147
5.2. Identificación y caracterización de las variantes de <i>splicing</i> del gen <i>HMGCLL1</i>	149
5.3. Localización subcelular de la proteína HL-Like1	153
5.4. Estudio diferencial de las proteínas HL-Like1 y HL por tejidos	154
5.4.1. Características cinéticas de las proteínas HL-Like1 y HL	155
5.4.2. Desarrollo de un anticuerpo específico contra la HL-Like1	157
5.4.3. Comparación por tejidos de la actividad y nivel de expresión de las proteínas HL-Like1 y HL	158
5.5. Estudio de la interacción de la proteína HL-Like1 con la tubulina	163
6. CONCLUSIONES	167
7. REFERENCIAS	169
7.1. Referencias bibliográficas	169
7.2. Referencias localizadas en la red	186
8. ABREVIATURAS	187
9. PUBLICACIONES	191

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Durante los últimos diez años nuestro grupo de investigación se ha centrado en el estudio molecular de la aciduria 3-hidroxi-3-metilglutárica. Esta enfermedad, de carácter autosómico recesivo, está producida por la deficiencia de la HMG-CoA liasa mitocondrial (HL), enzima que cataliza el último paso de la síntesis de cuerpos cetónicos (Faull et al., 1976) y que está codificada por el gen *HMGCL*. Un trabajo continuado y metódico ha permitido que la península Ibérica se haya convertido en el lugar del mundo con más pacientes diagnosticados a nivel molecular. Además, en este tiempo, nuestro grupo ha comunicado el mayor número de variantes alélicas de la enfermedad, entre ellas, la segunda más frecuente del mundo, la denominada "mutación Mediterránea" (Pié et al., 1997).

En el año 2004 gracias al programa de búsqueda de cDNAs completos "The Mammalian Gene Collection", nuestro grupo identificó el mRNA *Homo sapiens* 3-hydroxymethyl-3-methylglutaryl-Coenzyme A lyase-like 1 o *HMGCLL1*, que posee una gran homología con el gen humano *HMGCL*. El posible hallazgo de un nuevo gen (*HMGCLL1*) de características análogas al *HMGCL* nos estimuló a profundizar en su estudio.

Los estudios preliminares sobre el gen *HMGCLL1* y la proteína que codifica (HL-Like1), quedaron recogidos en la Tesis de Sebastián Menao Guillén (2006). Sin embargo, quedaron sin responder cuestiones importantes en relación a las posibles variantes del gen *HMGCLL1*, y a la localización, función y distribución por tejidos de la nueva proteína. Por todo ello, el objetivo fundamental de este trabajo ha sido continuar con el estudio del gen *HMGCLL1* y de la proteína HL-Like1, para intentar responder a las preguntas de cómo es, dónde está y cuál es la función de esta nueva enzima humana.

1.1. Vías de la cetogénesis

Los ácidos grasos, al igual que los hidratos de carbono, son moléculas muy importantes en el metabolismo energético celular, constituyendo su oxidación la principal fuente de energía para muchos tejidos como el músculo cardíaco (Kodde et al., 2007).

La mayor parte de la degradación de los ácidos grasos se obtiene mediante la β -oxidación, un proceso mitocondrial en el que se produce la oxidación escalonada y eliminación de fragmentos de dos carbonos en forma de acetil-CoA. Este producto puede ser utilizado para la síntesis de cuerpos cetónicos o, a través del ciclo de Krebs, para formar CO_2 y H_2O . Cuando el acetil-CoA se acumula por encima de su capacidad de oxidación o de uso para la síntesis de ácidos grasos, se produce la cetogénesis. Se trata de una ruta anabólica, que se origina en la mitocondria, mediante la cual el acetil-CoA se transforma en cuerpos cetónicos: acetoacetato, β -hidroxibutirato y acetona. La síntesis de estos compuestos se realiza a través de cuatro pasos enzimáticos que se muestran en la figura 1.1.

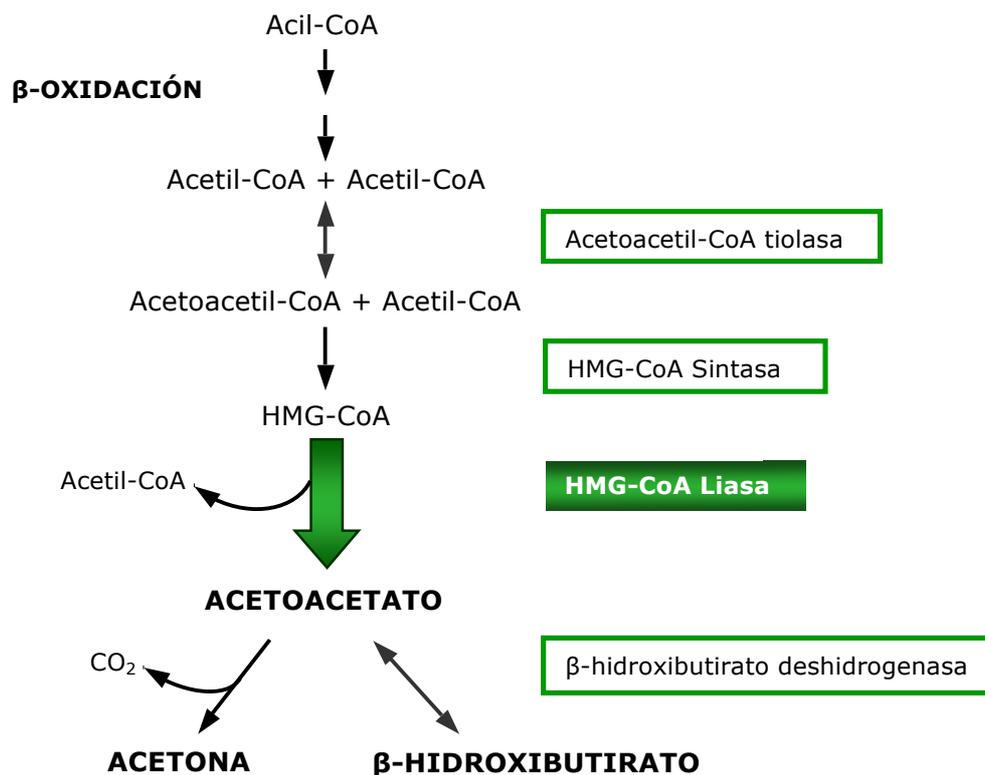


Figura 1.1. Reacciones enzimáticas de la ruta principal de la cetogénesis.

- En la primera reacción, dos moléculas de acetil-CoA se condensan para dar acetoacetil-CoA. Esta reacción está catalizada por la enzima acetoacetil-CoA tiolasa (E.C.2.3.1.9).

- A continuación, el acetoacetyl-CoA generado, reacciona con otro acetyl-CoA para formar el 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Ésta es una reacción de condensación llevada a cabo por la enzima HMG-CoA sintasa mitocondrial (mHS) (E.C.4.1.3.5).
- En la tercera reacción, el HMG-CoA se rompe dando acetoacetato, que es el primer cuerpo cetónico que se produce, y acetyl-CoA. Este paso está catalizado por la HMG-CoA liasa (HL) (E.C.4.1.3.4).
- En la cuarta reacción, el acetoacetato es reducido a β -hidroxibutirato, segundo cuerpo cetónico generado. La enzima que participa en dicha reacción es la β -hidroxibutirato deshidrogenasa (E.C.1.1.1.30).
- Alternativamente el acetoacetato puede sufrir una descarboxilación espontánea y formar acetona, tercer cuerpo cetónico.

El tejido principal donde se produce la cetogénesis es el hígado (Zammit, 1981). También se ha descrito, aunque en menor grado, en riñón (Nakatani et al., 1996), en intestino de ratas adultas (Thumelin et al., 1993), durante la lactancia de éstas (Bekesi y Williamson, 1990; Hahn y Taller, 1987), y en astrocitos corticales de ratas recién nacidas (Blázquez et al., 1998; Cullingford et al., 1998). Los cuerpos cetónicos se transportan desde allí a otros tejidos, en donde el acetoacetato y el β -hidroxibutirato pueden reconvertirse de nuevo en acetyl-CoA para la generación de energía. Así pues, los cuerpos cetónicos constituyen un combustible auxiliar cuando el catabolismo de los hidratos de carbono está limitado (Edmond et al., 1992; Zammit, 1981).

Los cuerpos cetónicos pueden estar elevados tanto en situaciones fisiológicas: ayuno (Balasse, 1979), ejercicio prolongado, dieta rica en grasas, embarazo (Herrera, 2002), etapa neonatal (Girard et al., 1985); como en situaciones patológicas: diabetes (Barrena et al., 2009), estados de obesidad y enfermedades relacionadas con defectos del metabolismo de la glucosa o del glucógeno (Mitchell et al., 1998 (a)).

La producción de cuerpos cetónicos en las mitocondrias hepáticas es un proceso complejo que está controlado con gran precisión (Guzmán y Geelen, 1993; Zammit y Moir, 1994). Los pasos mejor regulados son aquellos que determinan el aporte de ácidos grasos al hígado, su entrada a la mitocondria y la canalización del *pool* de acetyl-CoA hacia la síntesis de cuerpos cetónicos (Fukao et al., 2004).

La salida de ácidos grasos del tejido adiposo está regulada hormonalmente de manera compleja (Wang et al., 2008), lo que influye en la disponibilidad de sustrato para la β -oxidación y para la síntesis de cuerpos cetónicos.

La entrada de ácidos grasos de cadena larga a la mitocondria se produce a través de las enzimas Carnitina Palmitoil Transferasas I y II (CPT-I y CPT-II). La enzima CPT-I está regulada negativamente por el malonil-CoA, un éster de tres átomos de carbono, que también está implicado en el proceso de síntesis de ácidos grasos (Saggerson, 2008). Durante la lipólisis el nivel de malonil-CoA está disminuido y los ácidos grasos pueden entrar en la mitocondria. Sin embargo, cuando se produce la síntesis de ácidos grasos por parte de la acetil-CoA carboxilasa, el nivel de malonil-CoA aumenta, produciendo la inhibición de la CPT-I (Eaton, 2002).

En 1968 se propuso por primera vez la hipótesis de que la enzima HMG-CoA sintasa mitocondrial actuaba también como punto de control posterior a la reacción catalizada por la CPT-I (Williamson et al., 1968). Esta teoría fue apoyada por diferentes estudios (Dashti y Ontko, 1979), y quedó finalmente confirmada en 1988, en un trabajo con ratas diabéticas realizado por el grupo de la Dra. B.D. Grantham (Grantham y Zammit, 1988).

La enzima mHS está regulada a través de dos mecanismos: a corto plazo por succinilación y desuccinilación (Lowe y Tubbs, 1985), y a largo plazo por una regulación transcripcional. Ambos mecanismos de control están influenciados por factores nutricionales y hormonales (Hegardt, 1999). Esto justifica la importancia de la cetogénesis en la diabetes, en estados de inanición, en procesos donde se produce una lipólisis intensa, en el periodo fetal-neonatal y en la transición entre la lactancia materna y el destete (Hegardt, 1999).

Se considera, por tanto, que existen tres puntos de control en la síntesis de cuerpos cetónicos. El primero controla la salida de sustratos (ácidos grasos) del tejido adiposo; el segundo se encuentra a nivel de la reacción catalizada por la CPT-I y permite la entrada del sustrato a la mitocondria para que se produzca la β -oxidación; y el último se localiza dentro de la propia ruta cetogénica, a nivel de la enzima mHS.

Por otro lado, existe una ruta cetogénica alternativa a la descrita anteriormente, que tiene lugar a partir de sustratos procedentes del catabolismo de aminoácidos. Los animales consiguen un aporte importante de energía en la degradación de las proteínas, generando precursores glucogénicos o cetogénicos. Algunos aminoácidos, como la leucina (Thomas et al., 1982), durante su proceso de catabolismo, dan lugar a intermediarios cetogénicos mediante los cuales se pueden obtener acetoacetato, β -hidroxibutirato y acetona. Ambas rutas cetogénicas confluyen en la enzima HMG-CoA liasa mitocondrial (Figura 1.2).

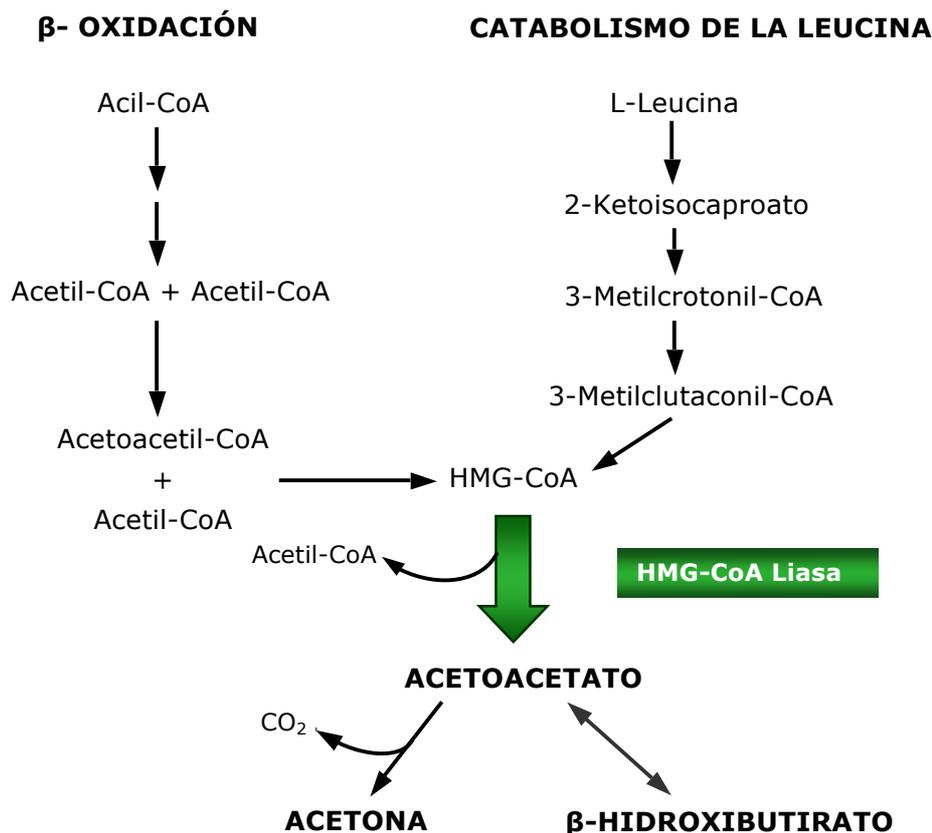


Figura 1.2. Convergencia de las rutas cetogénicas del acetil-CoA de la β -oxidación y del catabolismo de la leucina.

1.1.1. LA CETOGÉNESIS DURANTE EL DESARROLLO

La cetogénesis es un proceso metabólico importante durante el desarrollo y en las primeras etapas de la vida del individuo (Girard et al., 1985). Además, la expresión de la enzima HL parece ser imprescindible para la vida en modelos animales, ya que su ausencia provoca letalidad embrionaria (Wang et al., 1998). Sin embargo, esto no ocurre en humanos, ya que los pacientes con déficit de la HL tienen un desarrollo intra-uterino normal.

Algunos ejemplos de la importancia de los cuerpos cetónicos durante el desarrollo los encontramos en el cerebro inmaduro. Allí son unos precursores para la síntesis de aminoácidos (aspartato, glutamato y glutamina) más importantes que la glucosa, y están implicados en la biosíntesis de lípidos necesaria para el crecimiento y la reestructuración de conexiones celulares (Laeger et al., 2010).

Existen varios factores que entran en juego en los cambios experimentados en esta ruta y que abarcan desde factores hormonales y de disponibilidad de sustrato, hasta de actividad de las enzimas implicadas (Girard et al., 1985). Además, es necesario diferenciar entre la transición

entre la etapa fetal a la neonatal y la de la lactancia materna hasta el destete y la alimentación sólida.

En la transición de la etapa fetal a la postnatal, se incrementa la disponibilidad de ácidos grasos procedentes de los triglicéridos del tejido adiposo o del hígado, y de la leche materna. En humanos, los ácidos grasos utilizados para la síntesis de cuerpos cetónicos derivan principalmente de estas fuentes (Melichar et al., 1965). Sin embargo, en otras especies, como las ratas, la cetogénesis procede casi exclusivamente de los ácidos grasos de la leche materna y no de las reservas del tejido adiposo (Ferré et al., 1978).

En esta etapa aumenta la ratio glucagón:insulina plasmática. Se produce un marcado aumento del glucagón plasmático y un descenso de la insulina en humanos (Platt y Deshpande, 2005), ratas (Blázquez et al., 1974; Girard et al., 1973) y conejos (Callikan et al., 1979), lo que potencia la ruta cetogénica.

Los estudios, realizados principalmente en ratas, han demostrado que los ratios de oxidación de ácidos grasos y de síntesis de cuerpos cetónicos son muy bajos en el hígado fetal, pero que aumentan mucho en los recién nacidos durante el primer día de vida. Estos cambios van acompañados de un aumento de la actividad de la enzima CPT-I (Foster y Bailey, 1976) y de las enzimas implicadas en la ruta de síntesis del HMG-CoA (Hipolito-Reis et al., 1974; Lockwood y Bailey, 1971), así como de su nivel mRNA y proteína (Prip-Buus et al., 1995; Thumelin et al., 1993).

En la transición entre la lactancia y el destete también se producen cambios a diferentes niveles. Algunas de las enzimas que muestran una actividad elevada durante la etapa de la lactancia, y que están involucradas en la oxidación de ácidos grasos o en la cetogénesis, disminuyen notablemente su actividad hasta alcanzar los valores registrados en adultos a lo largo de esta etapa. Estos cambios han sido muy bien estudiados en el cerebro (Prins, 2008).

Además, se produce una disminución progresiva de la cantidad de glucagón en sangre mientras que aumenta la de insulina (Beaudry et al., 1977; Girard et al., 1977), lo que se relaciona con un descenso de la cetogénesis y un aumento de la lipogénesis hepática.

Todas estas acciones llevan hasta la "normalización" de la actividad de las enzimas de la ruta cetogénica que se encuentra en animales adultos, salvo las excepciones metabólicas comentadas anteriormente.

En la figura 1.3 se indican, de manera esquemática, los cambios producidos en la actividad enzimática de las principales enzimas del metabolismo de los cuerpos cetónicos en las primeras etapas de la vida de las ratas. Los datos se han obtenido de los artículos de Foster y Bailey (1976), Hipolito-Reis (1974) y de Lockwood y Bailey (1971).

Todas las enzimas ven incrementada su actividad durante los primeros días tras el nacimiento, para luego ir descendiendo de manera más o menos paulatina hasta los valores registrados en ratas adultas.

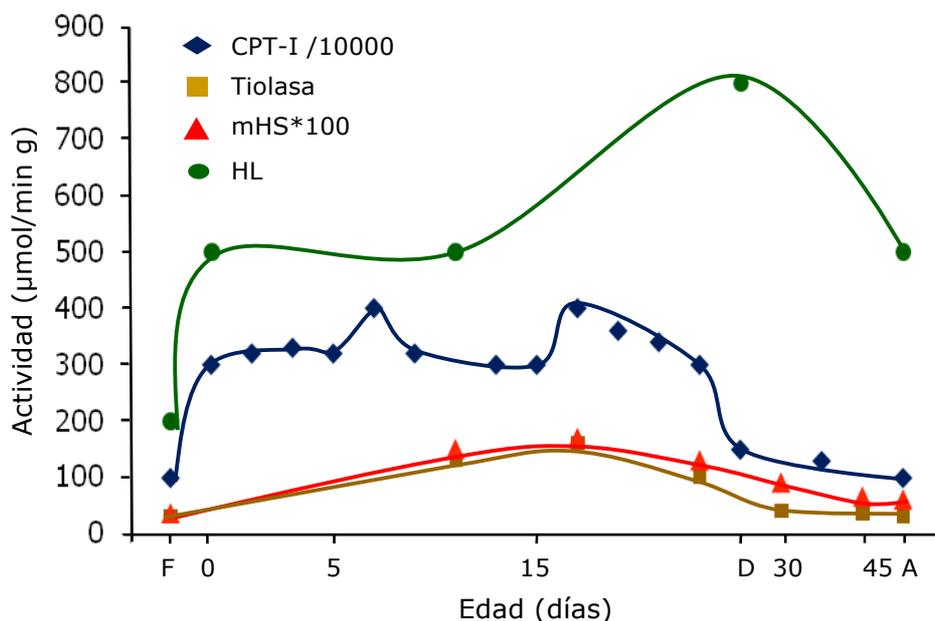


Figura 1.3. Actividad enzimática de algunas de las principales enzimas del metabolismo de los cuerpos cetónicos en las primeras etapas del desarrollo. F indica fetal, D destete (día 25) y A adulto.

1.2. Funciones de los cuerpos cetónicos

Los cuerpos cetónicos realizan diferentes funciones subcelulares en el organismo que van más allá de la producción de energía. Entre ellas se ha descrito que sirven como sustrato en la síntesis de lípidos y que actúan como reguladores del metabolismo (Robinson y Williamson, 1980).

La utilización de cuerpos cetónicos por los tejidos periféricos depende de dos enzimas: la Succinil-CoA Transferasa (SCOT) de localización mitocondrial (Williamson et al., 1971) y la Acetoacetyl-CoA Sintetasa (AACS) que se encuentra en citosol (Buckley y Williamson, 1973). Esta localización diferencial hace que ambas enzimas realicen funciones distintas. La SCOT está relacionada con la obtención de energía usando como fuente a los cuerpos cetónicos (Williamson et al., 1971), mientras que la enzima AACS está implicada en la síntesis de lípidos a partir de ellos (Buckley y Williamson 1973). Las rutas metabólicas en las que están implicadas ambas enzimas se muestran a continuación en la figura 1.4.

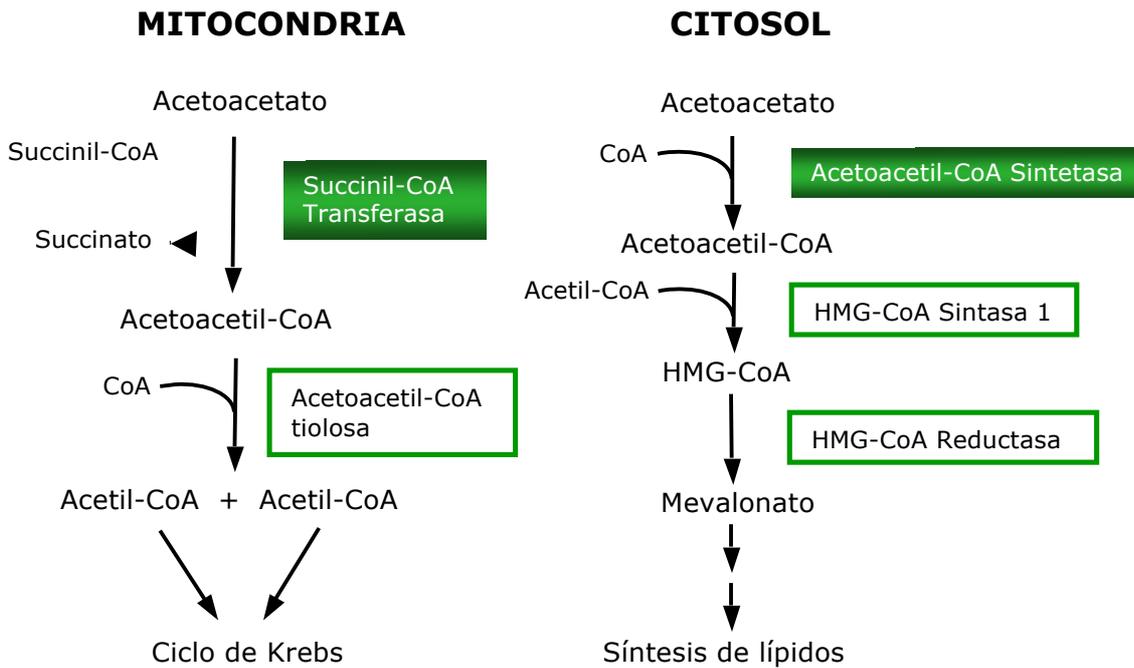


Figura 1.4. Comparación de las rutas metabólicas en las que están implicadas las enzimas Succinil-CoA Transferasa y Acetoacetyl-CoA Sintetasa, en el uso del acetoacetato como sustrato.

La enzima SCOT no se encuentra presente en el hígado, lo que explica su papel como productor de cuerpos cetónicos, pero no como consumidor de los mismos (Fukao et al., 1997).

Algunas de las funciones que llevan a cabo los cuerpos cetónicos en el organismo se detallan a continuación.

1.2.1. FUENTE DE ENERGÍA

La principal función de los cuerpos cetónicos es proporcionar al organismo una fuente de energía alternativa cuando no hay glucosa. Este hecho es de vital importancia para ciertos órganos como el cerebro (Morris, 2005), riñón (Baverel et al., 1995), corazón (Kodde et al., 2007), músculo esquelético (Zorzano et al., 2000), páncreas (Berne, 1975) e intestino delgado (Kimura e Ilich, 1991). Además, en determinadas etapas del desarrollo, como en el periodo postnatal, o durante periodos de ayuno prolongado puede ser el combustible energético principal, aportando hasta el 60% de la energía consumida por algunos tejidos, como el cerebro (Morris, 2005).

En situaciones metabólicas especiales como ayuno prolongado, enfermedad o dietas bajas en carbohidratos, la falta de cuerpos cetónicos puede comprometer seriamente la supervivencia, ya que el organismo no

dispone de una fuente de energía alternativa a la glucosa (Sweetman y Williams, 2001).

1.2.2. SÍNTESIS LIPÍDICA

La síntesis de lípidos procedentes de los cuerpos cetónicos se conoce desde 1973 (Buckley y Williamson, 1973). Se ha demostrado, en diversos estudios, que actúan como sustratos en el proceso de mielinización en el cerebro de neonatos (Lopes-Cardozo et al., 1984; Nehlig y Pereira de Vasconcelos, 1993) y, en menor grado, en la glándula mamaria durante la lactancia (Robinson y Williamson, 1977; Zammit, 1981).

El nivel de mRNA de la enzima AACS está elevado en los tejidos lipogénicos de ratas (Yamasaki et al., 2005), lo que sugiere un papel principal para los cuerpos cetónicos como sustrato en la síntesis de lípidos en estos tejidos.

La importancia de esta ruta se encuentra en tejidos como el cerebro, donde se utilizan como sustrato para la síntesis de esteroides que forman parte de la mielina de las neuronas (Lopes-Cardozo et al., 1984). En este sentido, se ha relacionado, en los últimos años, la expresión de la enzima AACS con la de la HMG-CoA Reductasa en el cerebro (Ohgami et al., 2003). Ambas enzimas se activan e inhiben bajo los mismos reguladores y el patrón de expresión en las distintas zonas del cerebro va en paralelo (Ohgami et al., 2003). En el cerebelo, la expresión de mRNA de la AACS está restringida a células de la glía (Ohnuki et al., 2005), lo que sugiere que la AACS tiene como papel principal proporcionar el colesterol necesario a las neuronas del cerebelo (Ohnuki et al., 2005).

1.2.3. ANTIOXIDANTE

Diferentes estudios han demostrado que el acetoacetato contribuye a la supervivencia y al mantenimiento funcional de distintas estirpes celulares (Squires et al., 2003; Maalouf et al., 2007). Este efecto protector se relaciona con su acción antioxidante.

Se ha demostrado que una combinación de acetoacetato y β -hidroxibutirato disminuye la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) formadas en el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial en cultivos de hipocampo de ratón (Maalouf et al., 2007; Noh et al., 2006). En estos estudios se demostró que los cuerpos cetónicos disminuían los niveles de NADH y la producción de ROS sin afectar al nivel de glutatión, antioxidante natural de las células.

Sin embargo, otros estudios han reportado que los cuerpos cetónicos aumentan la producción de ROS en otras células como cardiomiocitos y eritrocitos aislados (Jain y McVie, 1999; Pelletier y Coderre, 2007), por lo que

el papel que desempeñan podría variar en dependencia del tejido ante el que nos encontremos.

1.2.4. NEUROPROTECCIÓN

Muchos estudios han reportado la importancia de los cuerpos cetónicos en el metabolismo cerebral como agentes neuroprotectores (Guzmán y Blázquez, 2004; Maalouf et al., 2007, 2009).

En modelos *in vitro* de enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, añadir β -hidroxibutirato a los cultivos celulares mejoró la supervivencia de los mismos (Imamura et al., 2006; Kashiwaya et al., 2000; Tieu et al., 2003). La administración de β -hidroxibutirato en modelos, tanto *in vitro* (Kashiwaya et al., 2000) como *in vivo* (Van der Auwera et al., 2005) de Alzheimer también mostró una mejora en la neuroprotección. En otros trastornos neurológicos, como la esclerosis lateral amiotrófica, la dieta cetogénica produjo un efecto neuroprotector que ha sugerido su utilización terapéutica (Zhao et al., 2006). Esto ya es bien conocido para pacientes epilépticos que mejoran con dietas cetogénicas (Maalouf et al., 2009).

Además de su posible papel farmacológico en patologías neurológicas, también se ha relacionado el aumento de cuerpos cetónicos en plasma con una mayor tolerancia a las situaciones de hipoxia (D'Alecy et al., 1990; Eiger et al., 1980). Así, la administración de una dieta cetogénica durante tres semanas ha mostrado un incremento de la tolerancia a la hipoxia *in vivo* (Puchowicz et al., 2005).

A pesar de estos estudios, los mecanismos de neuroprotección de los cuerpos cetónicos no se conocen con precisión. Se cree que aumentan la eficiencia metabólica del metabolismo mitocondrial por disminución del consumo de oxígeno y de los niveles de NADH (Maalouf et al., 2007) y por aumento de la oxidación del coenzima Q (Veech et al., 2001). De ser así, estos mecanismos serían los mismos que explicarían su efecto antioxidante.

Mención aparte merecen los estudios de neuroprotección realizados en ciertos modelos de enfermedad neurológica, como la excitotoxicidad producida por glutamato o el estrés oxidativo. Así, la administración de acetoacetato durante 14 días, a roedores a los que se induce neurotoxicidad por glutamato, muestra un descenso del daño neuronal, una disminución del volumen de la lesión y una mejora en la producción de ATP (Massieu et al., 2003). Aunque inicialmente, como en los casos descritos anteriormente, no se conocían los mecanismos de estos efectos. En el año 2007, el grupo del Dr. G. Yellen propuso que tanto el β -hidroxibutirato como el acetoacetato reducían la despolarización neuronal espontánea en células del sistema nervioso central (Ma et al., 2007). Este efecto requería de la apertura de canales de potasio sensibles a ATP, sin embargo, el conocimiento de que los cuerpos cetónicos aumentan también el nivel de ATP celular que provoca el

cierre de dichos canales genera cierta controversia. Por esta razón, la importancia real de este efecto no ha sido totalmente aclarada en la actualidad.

Por otra parte, las investigaciones del grupo del Dr. M. Maalouf en las que se observaba un efecto neuroprotector de los cuerpos cetónicos frente a la neurotoxicidad producida por glutamato (Maalouf et al., 2007), abrió nuevas vías de investigación. Recientemente se ha demostrado que el acetoacetato inhibe al transportador de glutamato de las vesículas sinápticas (VGLUT) por competencia con el Cl^- , su activador alostérico. De este modo, parece que los cuerpos cetónicos provocan una disminución del glutamato en las vesículas presinápticas y una disminución del número de moléculas secretadas a la sinápsis (Juge et al., 2010).

De una manera más amplia, el mecanismo propuesto es el siguiente: el ayuno o la dieta cetogénica provocan cetosis, lo que aumenta la concentración de acetoacetato en sangre. Desde allí, el acetoacetato puede atravesar la barrera hematoencefálica y llegar hasta las neuronas, donde disminuye el número de moléculas de glutamato que se secretan a la hendidura sináptica, al inhibir a su transportador. La ingesta de carbohidratos disminuye los niveles de acetoacetato, lo que provoca la rápida activación de los transportadores VGLUT, permitiendo la entrada de glutamato a las vesículas sinápticas y restaurando, de esta manera, los niveles de glutamato en la hendidura sináptica y la neurotransmisión (Figura 1.5).

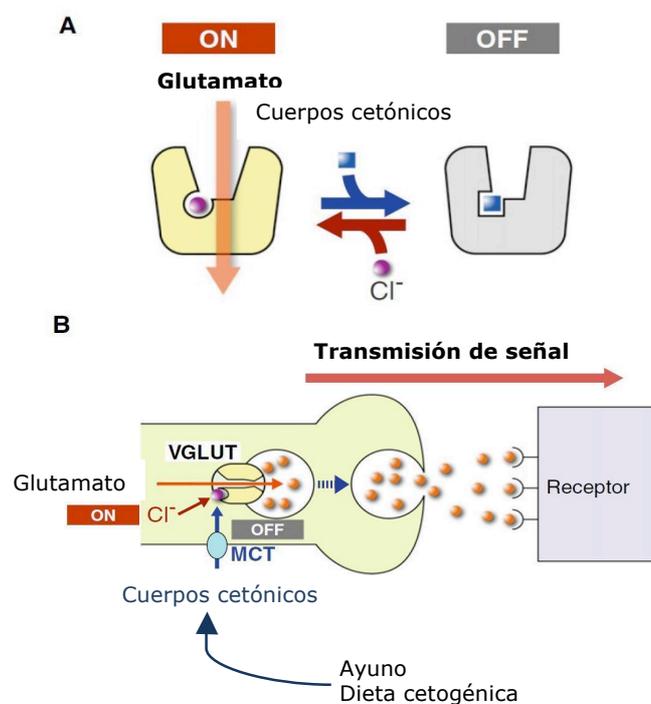


Figura 1.5. Mecanismo de acción de los cuerpos cetónicos propuesto. Imagen tomada del artículo de Juge et al., 2010.

1.2.5. ACTIVACIÓN DE LA SALIDA DE INSULINA

Aunque se sabe desde hace tiempo la capacidad que tienen los cuerpos cetónicos para potenciar la secreción de insulina (Goberna et al., 1974; Rhodes et al., 1985; Malaisse et al., 1990), hasta el año 2007 no se propuso un mecanismo que explicase los fenómenos que subyacen tras este efecto (MacDonald et al., 2007).

Recientes investigaciones, llevadas a cabo por el grupo del Dr. M.J. MacDonald, han mostrado un nuevo modo de regular la secreción de insulina en cultivos celulares (INS-1), que dependería de la transferencia de grupos acil (acetoacetato y citrato), entre la mitocondria y el citosol. Según esto, se produce un aumento en la expresión y actividad de enzimas como la piruvato carboxilasa, AACS, SCOT y ATP citrato liasa (Berne, 1975; MacDonald et al., 2005). El aumento en la actividad de estas enzimas provoca el transporte de sus productos hacia el citosol, produciendo un aumento de la concentración citosólica de acetoacetil-CoA y HMG-CoA (MacDonald et al., 2007), entre otros metabolitos.

Sin embargo, existen diferencias entre los niveles de activación de las distintas enzimas entre los islotes pancreáticos de humanos y de roedores (MacDonald et al., 2011). Las enzimas AACS y SCOT tienen un mayor nivel de expresión en los islotes pancreáticos humanos, y la actividad de la piruvato carboxilasa y la ATP citrato liasa es significativamente menor si la comparamos con la de los islotes pancreáticos de roedores (MacDonald et al., 2011). Estos hallazgos indican que el nivel de activación de las rutas implicadas en la exportación de los grupos acil desde la mitocondria hasta el citosol es diferente entre ambas especies, aunque el resultado final sea el mismo.

Por otra parte, son necesarios otros factores para que se produzca la secreción de insulina, ya que si sólo se necesitase un aumento, o bien de los acil-CoA de cadena corta, o bien de la síntesis de ATP, los cuerpos cetónicos serían suficientes para que se produjese esta secreción. Se ha sugerido que el incremento de NADPH en el citosol, debido al aumento del aporte de malato por la lanzadera piruvato-malato, podría ser un factor relacionado con la secreción de insulina (MacDonald, 1995, 2005).

Por otro lado, también se ha reportado que los cuerpos cetónicos, y más concretamente el β -hidroxibutirato, son capaces de inhibir el transporte de glucosa mediado por insulina en el músculo oxidativo (Yamada et al., 2010). El hecho de que el β -hidroxibutirato pueda ser al mismo tiempo beneficioso (fuente de energía) y negativo (provocar resistencia a insulina) en el mismo tejido puede responderse dentro del contexto de la "hipótesis del gen ahorrador" (Neel et al., 1998). Durante épocas de ayuno o de restricción calórica, la resistencia a insulina del músculo, puede ser beneficiosa al canalizar la glucosa sanguínea hacia otros tejidos como el cerebro. Los cuerpos cetónicos junto con los ácidos grasos libres son capaces

de proporcionar la energía suficiente al músculo, al mismo tiempo que inhiben la captación de glucosa. En periodos de buena alimentación los efectos negativos de los cuerpos cetónicos quedan, probablemente, minimizados.

1.3. Las isoenzimas HMG-CoA liasa mitocondrial y peroxisomal

La proteína 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A liasa o HMG-CoA liasa humana (HL) es una enzima que cataliza de manera irreversible la ruptura del 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA (HMG-CoA) en acetoacetato y acetil-CoA. Esta reacción supone el paso final común de la síntesis de cuerpos cetónicos y del catabolismo de la leucina (Faull et al., 1976).

La enzima está formada por 325 aminoácidos y su forma catalíticamente activa es un homodímero, el cual está formado por dos monómeros de HL idénticos unidos a través de un puente disulfuro (Roberts et al., 1994). Se ha demostrado que es más activa en forma de monómero que de dímero, por lo que se puede decir que la dimerización actúa como un mecanismo de regulación negativo (Kramer y Mizioroko, 1980).

La HL posee dos isoformas, una mitocondrial y otra peroxisomal. La isoforma mitocondrial está formada por 298 aminoácidos. La forma nativa contiene un péptido líder de 27 aminoácidos en el extremo N-terminal que dirige a la HL hacia la mitocondria. Una vez anclado a la membrana es cortado, liberando así la proteína madura de 298 aminoácidos. La función en este orgánulo es la de catalizar el corte del HMG-CoA en acetoacetato y acetil-CoA, reacción clave en la síntesis de cuerpos cetónicos y en el catabolismo de la leucina (Faull et al., 1976).

La proteína HL también se ha encontrado en los peroxisomas, hacia donde es dirigida por el tripéptido señal CKL situado en el extremo C-terminal. En este orgánulo la proteína está compuesta por 325 aminoácidos (Ashmarina et al., 1994). Al principio, se hipotetizó con que la isoforma peroxisomal pudiese ser monomérica (Ashmarina et al., 1996), pero posteriormente se identificó en forma de homodímero (Tuinstra et al., 2002). Aunque la actividad de esta isoforma es similar a la mitocondrial, su función dentro de los peroxisomas es desconocida. Se ha hipotetizado que podría intervenir en la síntesis de colesterol (Ashmarina et al., 1994) o en la degradación de ácidos grasos de cadena larga (Krisans, 1996), pero no hay resultados experimentales que lo confirmen.

La enzima HL no está regulada por factores hormonales, energéticos o post-traduccionales. Su mayor o menor actividad depende de la disponibilidad de sustrato que le proporciona la enzima inmediatamente

anterior de la ruta, la mHS, que sí está sometida a finos mecanismos de regulación (Hegardt, 1999).

1.3.1. EL GEN *HMGCL*

El gen que codifica la HL humana (Genomic Accesoión NT_004610.19) se localiza en el cromosoma 1, en la posición 1p36.1-p35. Está formado por 9 exones y 8 intrones con un tamaño total de 23,583 pares de bases. La región 5' no traducida presenta elementos característicos de un gen "housekeeping", como es la presencia de una isla CpG que contiene lugares de unión a SP1 (Wang et al., 1996). Este gen está ampliamente distribuido en la escala filogénica localizándose tanto en organismos eucariotas (humano, rata, pollo) como procariontes (*Pseudomonas mevalonii*).

El mRNA que codifica el gen *HMGCL* humano (Genomic Accesoión NM_000191.2) tiene un tamaño de 1.6 Kb. Este gen posee un *splicing* fisiológico que produce tres variantes: una con todos los exones que codifica una proteína activa y otras dos con deleciones de los exones 5 y 6 (NM_001166059.1) y 5, 6 y 7 sin actividad liasa (Muroi et al, 2000; Puisac et al., 2011). Las dos últimas variantes aparecen de forma muy minoritaria en tejidos productores de cuerpos cetónicos como hígado y riñón (Puisac et al., 2011).

Recientemente, estudios de expresión de mRNA del gen *HMGCL*, realizados mediante la técnica de Real-Time PCR, han demostrado una expresión tejido específica (Puisac et al., 2010). Así, el hígado, tal como era de preveer, presenta los niveles más elevados de mRNA, mientras que otros órganos como el páncreas, el testículo o el riñón han sorprendido con unos niveles también altos de mensajeros. Estos últimos datos están ayudando a comprender la patología y complicaciones asociadas a la deficiencia de la HL (Puisac et al., 2010).

1.4. La nueva enzima HMG-CoA Liasa-Like1

Tras el proyecto Genoma se han puesto en marcha los proyectos Transcriptoma y Proteoma. Gracias a ello, se ha ido acumulando mucha información de secuencias de DNA y proteínas. Las secuencias de nucleótidos se encuentran contenidas en distintas bases de datos, como el GenBank en EEUU, el EMBL en el Reino Unido y el DDBJ en Japón. Las secuencias de proteínas están recogidas en el SWISS PROT y en el PIR.

La estrategia que se sigue para la caracterización de cDNAs completos se basa en generar librerías de cDNA de diferentes vectores de clonaje a partir de tejidos y líneas celulares (Adams et al., 1992).

Uno de los cDNAs identificados mediante estas metodologías (Strausberg et al., 2002) ha sido el mRNA *Homo sapiens* 3-hydroxymethyl-3-methylglutaryl-Coenzyme A lyase-like 1 ó HMGCLL1 mRNA (cDNA clone MGC:33395 IMAGE:4818781), con número inicial de acceso en el GenBank de BC024194.1 con gi 18848223. Sin embargo, posteriormente han aparecido otras versiones de este gen que se comentaran en el desarrollo de este trabajo.

El hallazgo de este gen, por nuestro grupo, fue realizado de forma fortuita en el transcurso de una búsqueda de cDNAs completos relacionados con el gen *HMGCL* en la base de datos "The Mammalian Gene Collection". Tras el encuentro, nuestro laboratorio clonó y expresó el gen *HMGCLL1*, describiendo por primera vez las características de una nueva enzima la HMG-CoA liasa like1 (Tesis Sebastián Menao Guillén, 2006).

1.4.1. CARACTERÍSTICAS DEL GEN *HMGCLL1*

El gen que codifica para la HL-Like1 humana (Genomic Accesión NT_007592.15) está situado en el cromosoma 6 y, en un principio, se describió una organización genómica formada por 9 exones y 8 intrones con un tamaño total de 144,842 pares de bases. Sin embargo, recientemente han aparecido nuevas variantes del gen, como se explicará en el desarrollo de la tesis, que muestran una nueva organización genómica formada por 11 exones y 10 intrones. La región 5' no traducida presenta elementos característicos de un gen "housekeeping", como es la presencia de una isla CpG que contiene lugares de unión a SP1.

Utilizando la metodología de Real-Time PCR se ha visto que el gen *HMGCLL1* se expresa en numerosos tejidos (páncreas, testículo, placenta, intestino, pulmón y cerebro), con un patrón de expresión diferencial que cambia según las etapas del desarrollo (Tesis Sebastián Menao Guillén, 2006).

1.4.2. COMPARACIÓN DE LOS GENES *HMGCL* Y *HMGCLL1*

Los resultados iniciales, recogidos en la tesis de Sebastián Menao Guillén (2006), nos muestran la existencia de diferencias y similitudes entre ambos genes. Por ejemplo, tienen un 67% de concordancia a nivel del mRNA, pero su localización cromosómica es diferente. Esto parece indicar que nos encontramos ante genes parálogos, ya que comparten un alto grado de homología pero están situados en lugares distintos del mismo genoma. Probablemente estos genes tienen un origen evolutivo común y surgieron a través de algún tipo de duplicación génica (Strachan, 1992).

A nivel del promotor ambos genes poseen una isla CpG en su zona 5'UTR (UnTranslated Region) lo cual los define como "housekeeping". Este tipo

de genes son esenciales para el funcionamiento global de la célula y se expresan en la mayoría de los tejidos.

Para conocer en qué tejidos se expresa principalmente el gen *HMGCLL1* se han realizado estudios de PCR cuantitativa a tiempo real. De esta manera, se ha observado la diferencia de expresión de ambos genes en distintos tejidos humanos, tanto adultos como fetales. En tejido adulto, el gen *HMGCLL1* se expresa principalmente en páncreas, testículo, placenta, intestino, pulmón y cerebro, aunque ninguno de estos tejidos destaca de manera notable sobre los demás. Curiosamente, mientras que la expresión de *HMGCL* es máxima en hígado, en este tejido el *HMGCLL1* apenas se expresa (Tesis Sebastián Menao Guillén, 2006).

En tejidos fetales se ha observado que el nivel de expresión del gen *HMGCLL1* en el cerebro destaca sobre todos los demás, llegando incluso a superar el nivel de expresión de tejidos adultos. Sin embargo, la expresión del gen *HMGCL* en este órgano es muy baja.

Aunque el nivel de expresión del gen *HMGCLL1* es inferior al del gen *HMGCL*, la importancia que parece tener éste en el cerebro fetal, junto con su patrón característico de expresión tisular, sugiere que codifica una isoenzima con funciones diferentes.

1.4.3. COMPARACIÓN DE LAS PROTEÍNAS HL Y HL-LIKE1

Los estudios preliminares muestran una gran homología entre las proteínas HL y HL-Like1. Existe una analogía del 83% entre las secuencias aminoacídicas (Tesis Sebastián Menao Guillén, 2006) y los estudios bioinformáticos adelantan una gran similitud estructural.

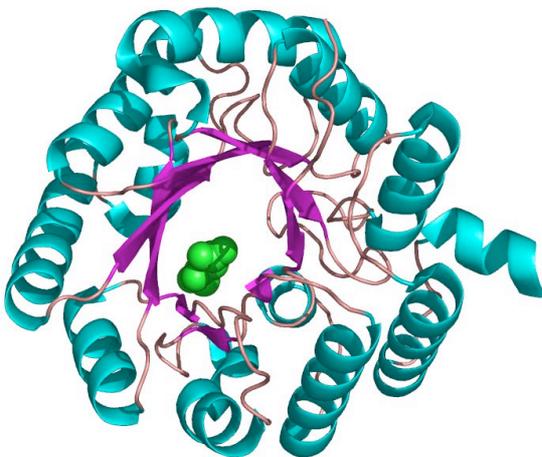


Figura 1.6. Modelo estructural de la proteína HL-Like1.

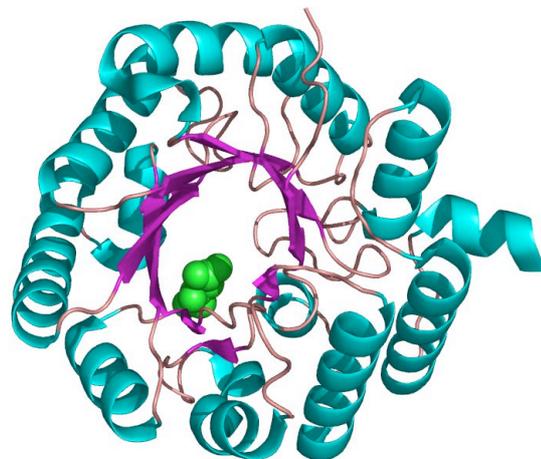


Figura 1.7. Modelo estructural de la proteína HL.

Los elementos de estructura secundaria son prácticamente iguales y los aminoácidos clave para la actividad catalítica de la HL (Arg⁴¹, Asp⁴², Glu⁷², Tyr¹⁶⁷, Cys²⁶⁶, Asn²⁷⁵, His²³³ e His²³⁵) están conservados también en la enzima HL-Like1 (Fu et al., 2006, 2010; Montgomery y Miziorko, 2011; Roberts et al., 1995, 1996, 1997; Tuinstra y Miziorko, 2003) (Figuras 1.6 y 1.7.). Estos residuos ocupan las mismas posiciones dentro de los elementos de estructura secundaria. Asimismo, la disposición del centro activo y del lugar que ocupa el sustrato dentro de éste es prácticamente idéntico.

Con estos datos se intuye que la nueva enzima HL-Like1 posee actividad liasa, lo cual ya se ha demostrado mediante ensayo enzimático, utilizando el método descrito por Wanders et al., 1988 (Tesis Sebastián Menao Guillén, 2006).

Todo ello nos ha llevado a proponer que la nueva enzima es una isoforma de la HL. Sin embargo, aún nos quedan muchas cosas por conocer y entre ellas y muy importante, su localización subcelular. La ausencia del péptido líder mitocondrial nos ha generado dudas sobre su ubicación. Por otro lado, los datos proporcionados por los programas bioinformáticos colocan al citosol como la localización más probable. Además, no debemos descartar la posibilidad de que su destino final sea el peroxisoma, ya que se ha descrito una isoforma de la enzima que actúa en ese orgánulo (Ashmarina et al., 1994), con lo que la HL-Like1 también podría hacerlo.

1.5. La tubulina

La tubulina es una proteína globular que forma parte de los microtúbulos del citoesqueleto celular. En la actualidad, se distinguen tres tipos de tubulinas: la alfa (α), la beta (β) y la gamma (γ). Todas ellas comparten en sus cadenas aminoacídicas una homología del 35 al 40% (Little y Seehaus, 1988). Las tubulinas α y β son las subunidades esenciales de los microtúbulos (MTs), mientras que la tubulina γ es un componente fundamental del centrosoma.

Comúnmente, se denomina tubulina a un heterodímero formado por dos subunidades α y β que al ensamblarse de manera altamente organizada, generan uno de los principales componentes del citoesqueleto, los microtúbulos. Durante el proceso de polimerización, la molécula de GTP unida a la tubulina β es hidrolizada (Desai y Mitchison, 1997), esto no parece afectar a la que está unida a la tubulina α . Los heterodímeros se ensamblan en una estructura denominada protofilamento, en el que la tubulina β de un dímero contacta con la tubulina α del dímero siguiente. Los protofilamentos interaccionan entre ellos lateralmente a través de contactos α - α y β - β (Chretien et al., 1995). La estructura de los MTs se indica en la figura 1.8.

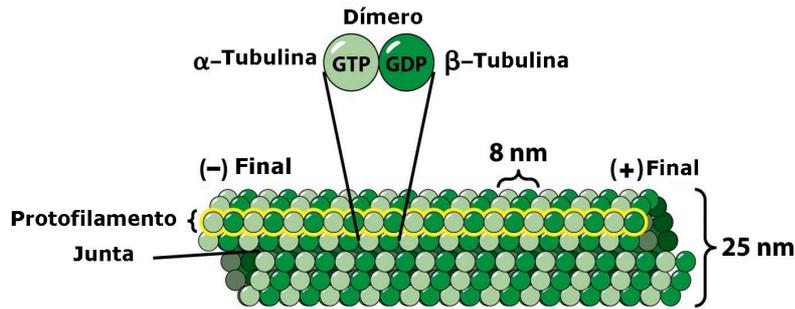


Figura 1.8. Estructura de un microtúbulo.

Los MTs son componentes del citoesqueleto que no sólo están involucrados en la división celular, sino que también contribuyen a la organización y compartimentalización de rutas de señalización en las células en interfase. Estas propiedades de los microtúbulos se deben a su organización en red dinámica que continuamente explora el citoplasma (Etienne-Manneville, 2009).

En las células eucariotas, algunos MTs se pueden estabilizar y las subunidades de tubulina que los forman pueden sufrir algunas modificaciones postraduccionales que influyen en las propiedades de los mismos (Perdiz et al., 2011). Una de estas modificaciones es la acetilación, que está emergiendo como uno de los principales mecanismos reguladores de las propiedades y funciones de los microtúbulos.

1.5.1. FUNCIÓN DE LA TUBULINA ACETILADA

La acetilación de la tubulina se produce en el aminoácido lisina 40 de la α -tubulina, tras el ensamblamiento de los MTs. La tubulina acetilada se encuentra en MTs estables, de vida larga y resistentes al nocodazol (Palazzo et al., 2003).

La tubulina acetilada es un regulador de la señalización celular y de mecanismos importantes en la célula como son la diferenciación, el estrés y la supervivencia. En muchos aspectos, todo esto permite a la célula integrar los estímulos y coordinar su respuesta a través de la red de MTs (Perdiz et al., 2011).

Los efectos de la tubulina acetilada en la célula son muy amplios. Se sabe que es crítica para el desarrollo y la función neuronal, ya que potencia el tráfico polarizado de proteínas en células asimétricas (Reed et al., 2006). Recientes investigaciones muestran un papel relevante de la tubulina en enfermedades degenerativas como el Huntington (Dompierre et al., 2007) o el Parkinson (Outeiro et al., 2007).

También se ha encontrado que la tubulina acetilada participa en la regulación de varias vías de señalización al modular la actividad y la

localización de las proteínas de la membrana plasmática. Un ejemplo interesante es el de la Na^+K^+ -ATPasa, cuya interacción con la tubulina acetilada provoca su inhibición (Arce et al., 2008).

Sin embargo, en la mayoría de los casos, la función reguladora llevada a cabo por la tubulina acetilada se observa de manera indirecta y, a menudo, depende del reclutamiento o de la activación de las enzimas deacetilasas HDAC6 y SIRT2 (Schemies et al., 2009), que actúan modificando a la tubulina.

Otros procesos celulares en los que participa la tubulina acetilada implican desde la conexión entre distintos orgánulos subcelulares (Burgess et al., 1991; Friedman et al., 2010), hasta la regulación de la señalización de diferentes rutas metabólicas (Perdiz et al., 2011).

Todos estos datos refuerzan la idea de que la red de MTs es una llave moduladora de las señales complejas de los orgánulos y sugieren que la acetilación de la tubulina podría actuar como un mecanismo de regulación del transporte basado en MTs y en la generación de señales complejas de los orgánulos.

1.5.2. POSIBLE RELACIÓN ENTRE LA TUBULINA ACETILADA Y LA HL-LIKE1

La relación existente entre la tubulina acetilada y la ruta cetogénica se establece a través de histonas deacetilasas (HDAC), como la HDAC1, y el efecto que ejercen sobre el promotor de la HMG-CoA sintasa mitocondrial. Se ha relacionado un aumento de la actividad de la HDAC1 con la hipoacetilación del promotor de la enzima mHS, lo que desencadena una disminución de su transcripción y actividad (Camarero et al., 2003). Si la actividad de la mHS disminuye, la HL tendrá una menor disponibilidad de sustrato y, en consecuencia, su actividad también disminuirá.

Las HDACs también tienen como sustrato a la tubulina, provocando la deacetilación de la misma (Matsuyama et al., 2002). Con estos datos podríamos relacionar un aumento de la cantidad de tubulina acetilada con un incremento de la acetilación del promotor de la mHS y un aumento de su actividad, y, por tanto, de la ruta cetogénica.

Sin embargo, las enzimas mHS y HL son mitocondriales y la tubulina es una proteína citosólica, por lo que, si existe una relación entre ambas proteínas, no puede ser por interacción directa.

Los datos bioinformáticos colocan al citosol como el compartimento subcelular más probable para la HL-Like1 y, de confirmarse su localización extra-mitocondrial, se podría hipotetizar con una posible relación entre las proteínas tubulina y HL-Like1. Estos mismos datos informáticos muestran a la hélice α -12 de la enzima HL-Like1, como el hipotético lugar de interacción

entre las dos proteínas (HL-Like1 y tubulina). Por esta razón, uno de los objetivos de esta tesis ha sido la caracterización de la interacción entre ambas proteínas.

OBJETIVOS

- 1. Confirmar y definir el modelo estructural de la HL-Like1 mediante el intercambio de mutaciones homólogas entre los genes *HMGCL* y *HMGCLL1*.**
- 2. Identificar y caracterizar las posibles variantes fisiológicas de *splicing* del gen *HMGCLL1*.**
- 3. Localizar a nivel subcelular la enzima HL-Like1 y estudiar la interacción de la nueva enzima con la membrana del retículo endoplasmático.**
- 4. Caracterizar las constantes cinéticas de la nueva isoenzima y su actividad por tejidos.**
- 5. Caracterizar el nivel de proteínas HL y HL-Like1 en tejidos adultos y fetales desarrollando un anticuerpo específico para la nueva enzima.**
- 6. Estudiar la interacción de la HL-Like1 con la tubulina.**

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

En este capítulo se detallan los materiales utilizados y los métodos empleados en la elaboración de este trabajo. Para los estudios en tejidos humanos se ha recurrido a paneles de cDNA de tejidos adultos y fetales, y también a tejidos procedentes de autopsias.

Los métodos empleados han sido tanto de tipo experimental como bioinformático. Entre los primeros destaca el gran número de clonajes realizados para la consecución de los diferentes objetivos.

MATERIAL

3.1. Muestras biológicas analizadas

El material utilizado ha consistido en paneles comerciales de cDNA de distintos tejidos así como en diferentes tejidos humanos obtenidos post-mortem. La obtención de muestras humanas ha sido posible gracias a la colaboración con el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario "Lozano Blesa".

3.1.1. PANELES COMERCIALES DE cDNA

Para el estudio del *splicing* alternativo del gen *HMGCLL1* en distintos tejidos, se han utilizado paneles de cDNA comerciales "Human Multiple Tissue cDNA MTC Panels" (BD Biosciences), con las siguientes características:

- Elevada pureza.

- Inclusión de varios cDNAs de primera cadena de tejidos humanos, generados a partir de poliA RNA o RNA total, donde el RNA está libre de contaminación de DNA.
- Mezcla de cDNA de varias personas sanas, de ambos sexos, de raza caucasiana, con edades comprendidas entre 14 y 69 años en el caso de los tejidos adultos, y de abortos espontáneos, de fetos de 16 a 37 semanas de gestación, en el caso del cDNA de tejidos fetales.
- Normalización de las preparaciones de cDNA frente a cuatro genes "housekeeping" diferentes. De esta manera se han estandarizado las cantidades de cDNA presentes en cada panel, permitiendo una determinación precisa de la especificidad y la abundancia relativa en los distintos tejidos.

Los tejidos humanos adultos utilizados han sido: cerebro, pulmón, riñón, músculo esquelético, bazo, corazón, hígado, páncreas, testículo, placenta, intestino y ovario. Los cDNAs de tejidos fetales han sido: cerebro, pulmón, riñón, músculo esquelético, bazo, corazón e hígado.

3.1.2. CULTIVOS CELULARES

Los estudios en cultivos celulares se han realizado en células HEK293 que son células embrionarias de riñón humano (Human Embryonic Kidney, HEK). Estas células son generadas por la transformación del genoma esquilado del adenovirus 5 en las células embrionarias humanas del riñón (Graham et al., 1977). Se trata de una línea celular usada comúnmente debido a su alta eficacia de transfección.

3.1.3. TEJIDOS HUMANOS

Los estudios de actividad, localización subcelular y evaluación del nivel de proteínas HL-Like1 y HL se han realizado en tejidos humanos obtenidos gracias al Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario "Lozano Blesa".

Todos los tejidos se obtuvieron de autopsias de diferentes individuos. En ningún caso las personas padecían enfermedad metabólica o diabetes que pudiese alterar los resultados obtenidos. Los tejidos se obtuvieron 24 horas después del fallecimiento y durante ese tiempo los cuerpos se mantuvieron a 4 °C. Una vez tomadas las muestras, éstas se mantuvieron a -80 °C hasta su uso.

También se obtuvieron tejidos fetales procedentes de la autopsia de dos fetos, procedentes de un embarazo gemelar, donde se produjo un aborto espontáneo a las 20 semanas de gestación.

Se tomaron muestras representativas, de aproximadamente 1 gr, de

los siguientes tejidos adultos: hígado, páncreas, riñón, músculo esquelético, corazón, cerebro y testículo; y en menor medida de los siguientes tejidos fetales: cerebro, corazón, hígado, pulmón, páncreas, riñón, músculo esquelético, bazo, testículo y ovario.

3.2. Mutaciones caracterizadas en pacientes con deficiencia de HL

Para el estudio de comparación de mutaciones homólogas entre las proteínas HL y HL-Like1, se ha tomado como material de partida y referencia las siguientes mutaciones (algunas de ellas han sido recientemente descubiertas, pero por motivos de espacio y de objetivos su caracterización no se ha incluido en esta tesis):

- Mutante R41Q: se trata de la mutación más frecuente en pacientes con déficit de HL. Ha sido descrita en más de 40 pacientes en todo el mundo y su fallo provoca la pérdida total de actividad enzimática (Mitchell et al., 1998 (b); Ozand et al., 1991). El aminoácido implicado, la Arg⁴¹, está directamente involucrado en la catálisis de la reacción y forma un puente de hidrógeno con la Glu⁷² de la enzima. Su cambio por una Gln impide la formación de esta unión.
- Mutante H233R: se trata de una mutación que afecta a la unión del sustrato con el catión divalente. La His²³³ es un aminoácido de unión con el ligando Mg⁺² que se encuentra en el centro activo de la enzima HL (Fu et al., 2006). Su cambio por una Arg provoca la pérdida de actividad de la enzima en los pacientes afectados (Roberts et al., 1996).
- Mutante F192S: esta mutación fue co-descubierta por el Dr. Sebastián Menao Guillén (2006) y por la doctoranda (Menao et al., 2009). Su fallo afecta a una zona más periférica de la enzima pero que también produce la pérdida de actividad enzimática. Está formando un cluster hidrofóbico, integrado por los residuos Ile¹²⁶, Phe¹⁵⁰, Val¹⁶⁸ y Val¹⁸⁸. El cambio por una Ser, puede provocar la desestabilización del cluster y la pérdida de actividad enzimática (Menao et al., 2009).

MÉTODOS

3.3. Comprobación de la homología estructural entre las enzimas HL-Like1 y HL

Los datos bioinformáticos preliminares respecto a la estructura de las proteínas HL-Like1 y HL nos indican que existe una gran homología entre ambas. Sin embargo, esta similitud no se ha demostrado de manera experimental y el modelo que se tiene de la HL-Like1 se ha basado en un modelo in silico de la HL. Recientemente la HL ha sido cristalizada (Fu et al., 2006), por esta razón pretendemos obtener un nuevo modelo bioinformático para la HL-Like1. Por otro lado, queremos reproducir algunas de las mutaciones que presentan los pacientes con deficiencia 3-hidroxi-3-metilglutárica, y que cursan con pérdida de la actividad de la enzima HL, en la proteína HL-Like1, para comprobar si también producen una pérdida de actividad en ésta última.

3.3.1. OBTENCIÓN DE UN MODELO BIOINFORMÁTICO PARA LA HL-LIKE1

Este trabajo ha sido desarrollado gracias a la ayuda y colaboración del Prof. Paulino Gómez Puertas del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa CSIC-UAM.

El modelo estructural de la enzima HL-Like1 humana se ha realizado por homología de secuencias. Para ello se han utilizado herramientas bioinformáticas basadas en algoritmos para la predicción de estructuras tridimensionales. En la elaboración del modelo tridimensional se ha partido de la estructura de una proteína cristalizada con la que la proteína de interés guarda un elevado grado de homología. En nuestro caso se ha utilizado la HMG-CoA liasa humana (Fu et al., 2006). El grado de identidad hallado entre ambas proteínas ha sido del 67%.

Se ha llevado a cabo un alineamiento múltiple entre la HL y la HL-Like1. Los programas utilizados han sido el Blast EMBL (Altschul y Lipman, 1990) y el Clustalw (Thompson et al., 1994). El alineamiento ha permitido conocer los aminoácidos conservados y los que cambian entre ambas proteínas. En el modelo final 3D los aminoácidos conservados ocupan la misma posición que los de la estructura cristalina de referencia, mientras que los que cambian, se ha tenido que calcular su posición a partir de la información de otras proteínas.

Para el modelado de la estructura HL-Like1 se han utilizado los programas Swiss-Pdb Viewer y el servidor Swiss-Model (Guex y Peitsch, 1997; Guex et al., 1999; Peitsch, 1995, 1996). El modelo ha sido validado

utilizando los programas ProsaII (Sippl, 1993), GAT-CHECK (Hooft et al., 1996), WHAT-IF (Vriend, 1990) y PROCHECK (Laskowski et al., 1993). La interacción entre el ácido 3-hidroxiglutarico y el modelo de la enzima HL-Like1, ha sido calculado utilizando el programa "docking hex" basado en las correlaciones polares esféricas de Fourier (Richie y Kemp, 2000).

El programa utilizado para la visualización del modelo de la HL-Like1 ha sido RASWIN.

3.3.2. INTRODUCCIÓN DE MUTACIONES HOMÓLOGAS DE LA HL EN LA HL-LIKE1 EN EL MODELO PROPUESTO

Una vez obtenido el nuevo modelo estructural de la HL-Like1 se introdujeron en el mismo las mutaciones R56Q, F207S y H248R, y se comprobó el cambio que producían sobre la conformación de la enzima.

Se emplearon los mismos programas y aplicaciones que las explicadas en el punto 3.3.1.

3.3.3. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

La mutagénesis dirigida es una técnica *in vitro* que permite sustituir uno o varios aminoácidos específicos de una proteína. Para ello debemos partir de un plásmido en el cual tengamos clonado nuestro gen a estudio, que queremos mutar. A partir de este plásmido y con primers específicos que introduzcan la mutación deseada, se puede obtener el gen mutado de manera específica. Este método facilita el estudio de la relación entre la estructura de una proteína y su función, ya que nos permite introducir cambios en aminoácidos concretos.

En nuestro caso lo hemos utilizado para comprobar la homología estructural entre las proteínas HL-Like1 y HL, tomando como plásmido de partida el obtenido por el Dr. Sebastián Menao Guillén durante la realización de su tesis doctoral, el HL-Like1-pMAL-c2x, que permite la expresión de la proteína en un modelo eucariota.

El esquema general de la mutagénesis dirigida consiste en: sintetizar la hebra mutada, digerir la hebra molde con DpnI y transformar el plásmido mutado obtenido.

Existen diversas formas de realizar la mutagénesis dirigida. En este trabajo se ha elegido la estrategia que realiza una PCR con primers específicos. Para ello se ha utilizado el kit "Quiz Change II Site-Directed Mutagenesis" de Stratagene.

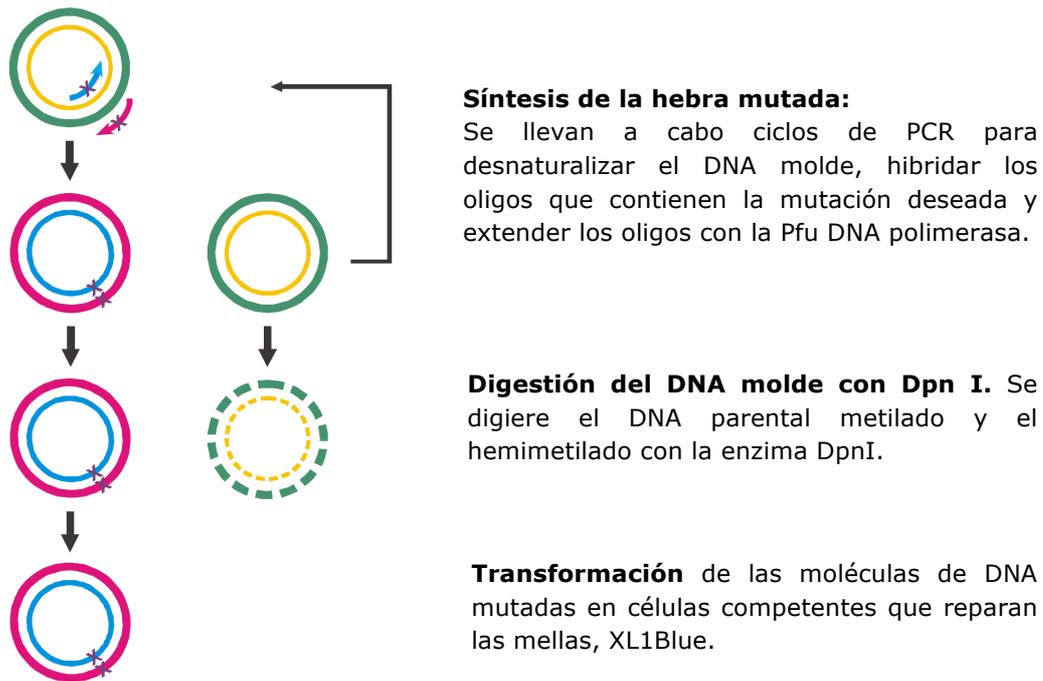


Figura 3.1. Esquema del proceso de mutagénesis dirigida mediante PCR.

3.3.3.1. PCR de la mutagénesis dirigida

El DNA que se ha empleado como molde es el plásmido recombinante HL-Like1-pMAL-c2x, obtenido durante la tesis de Sebastián Menao Guillén. En este vector tenemos la proteína HL-Like1 clonada junto con la proteína Maltosa Binding Protein (MBP), lo que nos permite su obtención y purificación de una manera rápida y sencilla.

Las mutaciones que se han reproducido en la enzima HL-Like1 son:

- R56Q (R41Q en la HL): es la mutación más frecuente en pacientes con déficit de la enzima HL.
- H248R (H233R en la HL): el aminoácido histidina 233 está implicado en el centro catalítico de la enzima y su cambio provoca la pérdida total de actividad liasa.
- L207S (F192S en la HL): aunque este aminoácido no está conservado entre ambas proteínas sí que conserva su naturaleza apolar. La mutación F192S encontrada en un paciente con deficiencia de HL provocó la pérdida total de actividad liasa.

Los primers utilizados para la realización de los diferentes mutantes se muestran en la siguiente tabla.

Primer	Secuencia 5' → 3'
HL-Like1 R56Q F	GAAGTTGGGCCT CA GGATGGATTGC
HL-Like1 R56Q R	GCAATCCATCCT GA GGCCCAACTTC
HL-Like1 H248R F	GCTCTTGCTGTT CG CTGTCATGAC
HL-Like1 H248R R	GTCATGACAG CG AACAGCAAGAGC
HL-Like1 L207S F	GTCTAAGAGAT CG TACGGCATGG
HL-Like1 L207S R	CCATGCCGTAC GA TCTCTTAGAC

Tabla 3.1. Primers utilizados para la mutagénesis dirigida de la proteína HL-Like1. En negrita se indica el nucleótido mutado.

También se utilizó la técnica de mutagénesis dirigida para obtener la proteína recombinante con la delección del exón 6 y estudiar su posible actividad enzimática. Los primers diseñados para esta variante de *splicing* se muestran a continuación.

Primer	Secuencia 5' → 3'
HL-Like1 del 6 F	CCAGATGGGTACCACAGGTTGCTGCTGGAGCTAC
HL-Like1 del 6 R	GTAGCTCCAGCAGCAACCTGTGGTACCCATCTGG

Tabla 3.2. Primers utilizados para la mutagénesis de la variante de *splicing* con delección del exón 6 del cDNA del gen *HMGCLL1*.

La mezcla de reacción y el programa de PCR utilizado para la realización de la mutagénesis dirigida se indican en las siguientes tablas.

Reactivos	Cantidad
Buffer 10X	5 µl
dNTPs 1mM	1 µl
DNA plasmídico	50 ng
Primer forward	125 ng
Primer reverse	125 ng
Pfu DNA polimerasa (2,5 U/µl)	1 U
Agua miliQ estéril	c.s.p. 50 µl

Tabla 3.3. Componentes de la reacción de PCR para la mutagénesis dirigida.

	Temperatura	Tiempo
Inicio	98 °C	2'
Desnaturalización	96 °C	30''
Hibridación	58 °C	30''
Extensión	68 °C	7'
Extensión final	68 °C	10'

} 12 ciclos (1)

Tabla 3.4. Programa de PCR de la mutagénesis. (1) 18 ciclos para la variante de *splicing*.

3.3.3.2. Digestión con DpnI

Una vez terminada la reacción de mutagénesis se añade sobre el producto de PCR 1 µl de la enzima DpnI, endonucleasa que digiere el DNA metilado y hemimetilado. Esto permite eliminar las hebras de DNA original que no contienen la mutación. La mezcla de reacción se incuba durante una hora a 37 °C.

3.3.3.3. Transformación de los plásmidos mutados en *E. coli*

Una vez que se han obtenido los plásmidos se deben introducir en las células huésped para poder seleccionar aquellos que hayan introducido la mutación, así como obtener un número elevado de copias de los mismos.

Las células con capacidad de ser transformadas (de captar DNA) se denominan competentes. La competencia se induce en *E. coli* por un tratamiento con cloruro de calcio que afecta a la pared celular. Las células competentes se mantienen en contacto con el DNA en un medio con CaCl₂ y a 0 °C por un periodo de tiempo durante el cual el DNA se adhiere a los lugares accesibles de la pared. Un corto choque térmico posterior favorece la incorporación del DNA. Las células se recuperan por incubación a 37 °C, durante aproximadamente una hora, antes de ser sembradas en el medio de cultivo.

El protocolo seguido se indica a continuación.

1. Coger una alícuota de 75 µl de células competentes *E. coli* XL1 blue, que deben estar guardadas a -80 °C y ponerlas en hielo.
2. Añadir 8 µl del producto de la mutagénesis a los 75 µl de las células competentes, en tubos de polipropileno especiales para la transformación.
3. Incubar la mezcla durante 30 minutos en hielo.
4. Someter al incubado a un choque térmico de 45 segundos en un baño a 42 °C seguido de 2 minutos en hielo.
5. Añadir 200-300 µl de medio de cultivo de cultivo SOC, previamente atemperado, a la llama (condiciones estériles) e incubar a 37 °C durante una hora con agitación de 200 rpm.
6. Sembrar en una placa de LB-agar suplementada con ampicilina, a la llama.
7. Dejar crecer en la estufa a 37 °C durante toda la noche (O/N).

3.3.3.3.1. Cepas bacterianas

Para el clonaje de plásmidos recombinantes y la expresión de proteínas recombinantes, se han utilizado las siguientes cepas de *Escherichia coli*.

- **XL1blue:** con genotipo *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tetr)]*. Resistente al ácido nalidíxico y a tetraciclina (proporcionada por el plásmido F). Esta cepa está indicada para la obtención de plásmidos recombinantes.
- **BL21 (DE3):** con genotipo *F⁻ hsdS (r_β⁻ m_β⁻) ompT lon⁻ galλ (DE3)* (Novagen). Lisógena del fago λDE3, que incorpora el gen de la T7-RNA polimerasa bajo el control del promotor lacUV5. Inducible por IPTG y deficiente del tipo pGEX y pMAL. Es una cepa de expresión libre de proteasa endógenas, lo que la hace ideal para la obtención de proteínas recombinantes.

3.3.3.3.2. Medios líquidos

Los medios de crecimiento bacteriano han sido los siguientes:

- **Medio SOC.** Este medio es más rico en nutrientes que el LB. En la siguiente tabla se indica su composición.

Reactivos	Cantidad añadida
Triptona	20 gr
Extracto de levadura	5 gr
NaCl	0,5 gr
MgCl ₂	0,94 gr
MgSO ₄	1,2 gr
Glucosa	0,36 gr
Agua destilada	c.s.p. 1 L

Tabla 3.6. Composición del medio SOC.

- **Medio LB (Luria-Bertani).** Está formado por los reactivos indicados en la siguiente tabla.

Reactivos	Cantidad añadida
Bactotriptona	10 gr
Extracto de levadura	5 gr
NaCl	5 gr
Agua destilada	c.s.p. 1 L

Tabla 3.5. Composición del medio LB.

- **Medio LB-ampicilina.** Tiene la misma composición que el anterior pero debe suplementarse con 50 µg/ml de ampicilina. Este medio se utiliza para el crecimiento de los vectores portadores de resistencia a

este antibiótico. Se debe autoclavar antes de añadir la ampicilina, ya que ésta se descompone a elevadas temperaturas y no es funcional.

- **Medio LB-kanamicina.** Tiene la misma composición que el anterior pero debe suplementarse con 50 µg/ml de kanamicina. Este medio se utiliza para el crecimiento de los vectores portadores de resistencia a este antibiótico. Se debe autoclavar antes de añadir la kanamicina, ya que ésta se descompone a elevadas temperaturas y no es funcional.

3.3.3.3.3. Medios sólidos

- **Placas de LB-agar.** Contienen los reactivos indicados en la tabla 3.7.

Reactivos	Cantidad añadida
Bactotripton	10 gr
Extracto de levadura	5 gr
NaCl	5 gr
Agar	15 gr
Agua destilada	c.s.p. 1 L
<i>Ajustar a pH 7.4 y esterilizar en autoclave.</i>	

Tabla 3.7. Composición de las placas LB-agar.

- **Placas de LB-agar-ampicilina.** Tiene la misma composición que las anteriores, pero deben suplementarse con 50 µg/ml de ampicilina.
- **Placas de LB-agar-kanamicina.** Tiene la misma composición que las anteriores, pero deben suplementarse con 50 µg/ml de kanamicina.

3.3.3.3.4. Preparación de células competentes

La competencia en las células se ha realizado por tratamiento con cloruro cálcico (CaCl₂), que afecta a la pared de las bacterias haciéndolas más permeables.

El protocolo seguido ha sido el siguiente:

1. Inocular en 3 ml de medio LB fresco una colonia única procedente de un cultivo en placa de la cepa correspondiente, o con 10 µl de cultivo glicerinado de ésta.
2. Incubar durante 12 horas a 37 °C en agitación a 250 rpm.
3. Diluir el cultivo anterior 1/50 en medio de cultivo LB fresco.

4. Incubar hasta alcanzar una DO_{595} aproximadamente de 0.5 (unas 2 ó 3 horas).
5. Transferir el cultivo a un tubo de polipropileno estéril de 50 ml y enfriar el cultivo en hielo durante 15 minutos.
6. Centrifugar a 4000xg durante 10 minutos a 4 °C. Decantar el sobrenadante y resuspender el pellet en 2 ml de disolución de $CaCl_2$, previamente enfriada en hielo.
7. Centrifugar a 4000xg durante 5 minutos a 4 °C. Eliminar el sobrenadante con cuidado de no despegar el pellet.
8. Resuspender el pellet en 2 ml de disolución de $CaCl_2$ y dejar reposar durante una hora en hielo picado.
9. Centrifugar a 4000xg durante 5 minutos a 4 °C. Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet en 1 ml de disolución de $CaCl_2$.
10. Finalmente, distribuir la suspensión en alícuotas de 100 μ l y guardar a -80 °C.

Reactivos	Concentración
$CaCl_2$	60 mM
Glicerol	15 %
PIPES pH 7.0	10 mM
<i>Se esteriliza por filtración</i>	

Tabla 3.8. Composición de la disolución de $CaCl_2$ para hacer células competentes.

3.3.3.4. Selección de las colonias positivas

La selección de las bacterias que han incluido el DNA recombinante correctamente, se ha llevado a cabo sobre medio sólido LB-Ampicilina. En este medio de cultivo solamente crecen las bacterias que han adquirido la resistencia a ampicilina.

No todas las colonias que crecen en el medio sólido con ampicilina contienen el DNA recombinante completo. Pueden haber adquirido la resistencia a ampicilina al haber incorporado en su genoma el plásmido vacío sin el inserto.

La comprobación de los clones positivos, que han incorporado el DNA recombinante de forma correcta, se ha efectuado mediante "PCR boiling" o por aislamiento del DNA plasmídico por "miniprep". Independientemente del método utilizado los clones positivos han sido finalmente secuenciados.

3.3.3.4.1. PCR boiling

Se basa en realizar una PCR directamente de las colonias que han crecido, para ver cuáles de ellas han incorporado el plásmido con el inserto. Se "pican" un número determinado de colonias y se sumerge cada una en un tubo con los reactivos de PCR. Las colonias se lisan por calor y se amplifica el fragmento clonado utilizando los primers de la siguiente tabla:

Primer	Secuencia 5' → 3'
malE F	GGTCGTCAGACTGTCGATGAAGCC
M13R	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC

Tabla 3.9. Primers para la realización de la PCR boiling.

Las concentraciones de los reactivos usadas para hacer la reacción se muestran en la tabla 3.10.

Reactivos	Concentración
Buffer 10X	1X
dNTPs	1mM
MgCl ₂	1.5 mM
Primers	20 pmol
cDNA	150 ng
Accu Taq polimerasa	1 U
Agua miliQ estéril	c.s.p. 50 µl

Tabla 3.10. Componentes de la reacción de PCR.

El programa de PCR aplicado se recoge en la tabla 3.11.

	Temperatura	Tiempo	
Inicio	98 °C	2'	} 30 ciclos
Desnaturalización	96 °C	30"	
Hibridación	56 °C	30"	
Extensión	72 °C	1'	
Extensión final	72 °C	10'	

Tabla 3.11. Programa de PCR.

Los productos de PCR se analizan en un gel de agarosa al 1% y las colonias positivas (aparece una banda correspondiente al tamaño del inserto) se hacen crecer en 5 ml de LB-ampicilina durante toda la noche. Finalmente se aísla el DNA plasmídico mediante "miniprep".

3.3.3.4.2. Electroforesis de los ácidos nucleicos en geles de agarosa

Una vez realizadas las PCRs, se debe comprobar si la amplificación se ha realizado de forma correcta. Para ello se ha empleado la técnica denominada electroforesis en geles de agarosa.

Los ácidos nucleicos son macromoléculas polianiónicas uniformemente cargadas, que pueden migrar en un campo eléctrico. La electroforesis en geles de agarosa es el método estándar que se utiliza para separar, identificar y purificar fragmentos de DNA. Esta técnica permite diferenciar fragmentos de DNA entre 100 pb y 23 Kb.

La visualización de los fragmentos de DNA se consigue mediante la incorporación al gel de un agente intercalante fluorescente (bromuro de etidio). El marcador se une a las cadenas de DNA y permite visualizar las bandas cuando el gel se ilumina con luz ultravioleta con una longitud de onda de 310 nm.

Para detectar la presencia de un fragmento de DNA de un tamaño determinado, se ha realizado una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, y se ha comparado con un marcador de DNA que contiene fragmentos de DNA de pesos moleculares conocidos. Lo mismo se ha realizado para comprobar que la digestión enzimática se ha realizado de manera correcta. Las disoluciones empleadas son TBE 10X y tampón de carga 2X (Tablas 3.12 y 3.13).

Reactivos	Cantidad	Reactivos	Concentración
Tris-base	108 gr	Glicerol	20%
Ácido bórico	55 gr	TBE	77.5%
EDTA 0.5 M	40 ml	Azul de Bromofenol	2.5%
Agua	c.s.p. 1L		
<i>Ajustar el pH a 8.0</i>		Tabla 3.13. Tampón de carga 2X.	

Tabla 3.12. TBE 10X (Tris-Borato-EDTA).

La masa molecular de un fragmento se puede determinar comparando su movilidad con la de marcadores de DNA de peso molecular conocido. Se han utilizado los siguientes marcadores:

- 100 pb DNA Ladder (Fermentas).
- DirectLoad™ Wide Range DNA Marker (Sigma).

3.3.3.4.3. Aislamiento del DNA plasmídico

Para separar el DNA plasmídico del DNA cromosómico, se someten las bacterias de un cultivo saturado a un proceso denominado "miniprep". Esta

separación se basa en la distinta solubilidad que tienen ambos tipos de DNA a pH alcalino, debido a su tamaño. A pH básico el DNA cromosómico se desnaturaliza y precipita mientras que el plasmídico no.

El protocolo para realizar la selección de colonias positivas de este modo es el siguiente:

1. Picar las colonias positivas y cultivar cada una de ellas en 5 ml de LB-ampicilina O/N.
2. Al día siguiente, efectuar las correspondientes minipreps con el kit "Illustra™ plasmidPrep Mini Spin Kit" (GE Healthcare).

El protocolo para realizar la miniprep es el siguiente:

1. Recuperar el cultivo celular en un eppendorf de 1.5 ml por medio de diferentes centrifugaciones de un minuto a 13000 rpm.
2. Resuspender el pellet con 200 μ l de disolución que contiene RNAsas.
3. Añadir 200 μ l de disolución de lisis y mezclar por inversión de 6 a 8 veces. Incubar cinco minutos a temperatura ambiente.
4. Añadir 350 μ l de disolución neutralizadora e invertir 6 u 8 veces.
5. Centrifugar 10 minutos a 13000 rpm.
6. Añadir el sobrenadante sobre la columna y centrifugar 1 minuto a 13000 rpm. Decantar el eluido.
7. Añadir 500 μ l de la disolución neutralizadora. Centrifugar 1 min a 13000 rpm. Eliminar el eluido.
8. Añadir 750 μ l de la disolución de lavado. Centrifugar 1 min a 13000 rpm y descartar el eluido. Repetir este paso una vez más.
9. Introducir la columna en un eppendorf y eluir el DNA plasmídico con 40 μ l de agua miliQ.

3.3.3.4.4. Secuenciación

Para comprobar que las colonias positivas han incorporado el inserto de forma correcta, éste ha de ser secuenciado. Es posible, que aun teniendo un inserto de tamaño adecuado, durante la amplificación inicial se haya producido alguna mutación.

La secuenciación permite identificar los nucleótidos que componen un determinado fragmento de DNA. Se ha utilizado un método de secuenciación automática que se basa en el uso de cuatro dideoxinucleotidos (terminadores de cadena) marcados con distintos fluorocromos.

La secuenciación de los distintos vectores se ha realizado en el servicio de secuenciación del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO)

en Madrid y el de Sistemas Genómicos (Valencia). Estos servicios de secuenciación se encargaban de realizar la reacción de secuenciación, purificación de la muestra y secuenciación propiamente dicha. El aparato utilizado fue un "Applied Biosystems 5700 DNA sequencer". La mezcla para la secuenciación estaba formada por los siguientes componentes.

Reactivos	Volumen
DNA (100 ng/ μ l)	2.5 μ l
Primer (1 μ M)	3.5 μ l
Agua	c.p.s. 15 μ l

Tabla 3.14. Componentes de la mezcla de secuenciación.

3.3.4. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS NATIVAS Y MUTADAS HL-LIKE1 Y HL

Una vez obtenidos los plásmidos recombinantes, nuestro objetivo es obtener, en gran cantidad, las proteínas clonadas sobreexpresándolas en un modelo procariota. Para ello empleamos la cepa de *E.coli* BL21.

Los pasos que se deben seguir para obtener las proteínas sobreexpresadas son los siguientes: inducción de la expresión de la proteína recombinante, ruptura celular del cultivo, purificación mediante cromatografía en columnas de amilosa y separación de la proteína de fusión mediante una proteasa específica.

3.3.4.1. Inducción de la expresión

Una vez que se tiene clonado el cDNA deseado en los vectores se procede a la expresión de la proteína recombinante mediante inducción con IPTG (isopropil- β -D tiogalactósido). El IPTG es un inductor del promotor P_{lac} , al que se une irreversiblemente. Esta unión impide la represión del promotor ejercida por la proteína codificada por el gen *lacI^q*, estimulando de esta manera la transcripción del DNA.

Se han probado distintas condiciones de inducción, variando la temperatura de inducción entre 18-22 °C, y la concentración de IPTG entre 0.1-0.3 mM. A continuación se detalla el protocolo de mayor rendimiento.

1. Añadir 10 μ l de la cepa a inducir a 25 ml de medio de cultivo LB + ampicilina e incubar a 37 °C durante 16 horas con agitación.
2. Diluir este cultivo 1:50 en medio LB-ampicilina.
3. Crecer el cultivo a 37 °C hasta que alcance una DO_{595} de 0.8-1.
4. Bajar la temperatura del agitador hasta 20 °C.

5. Inducir la expresión de la proteína recombinante con IPTG hasta una concentración final de 0.2 mM.
6. Incubar durante 16 horas a 20 °C con una agitación de 200 rpm.
7. Recuperar el pellet donde se encuentran las células por centrifugación a 3500xg 10 minutos.

3.3.4.2. Ruptura celular

Al igual que en el apartado anterior se han empleado distintos tampones y aditivos para lisar las células. Se indica la composición del tampón con el que se han conseguido mayores resultados. El proceso seguido ha sido el siguiente:

1. Resuspender el pellet obtenido en el paso anterior en un volumen adecuado de tampón de lisis. Esto dependerá del volumen de cultivo a romper y puede variar entre 3-10 ml.
2. Incubar 10 minutos en baño de hielo.
3. Incubar durante 20 minutos a 37 °C.
4. Congelar el pellet a -80 °C.
5. Descongelar el pellet de células.
6. Centrifugar a 15000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Nos quedaremos con el sobrenadante que es donde se encuentra nuestra proteína de fusión a estudiar.

La composición del tampón de lisis queda reflejada en la siguiente tabla.

Reactivos	Concentración
Tris Base	20 mM
NaCl	200 mM
EDTA	1 mM
Lisozima	1 mg/ml
DNasa	10 µg/ml
RNasa	10 µg/ml
PMSF	100 µg/ml
DTT	1mM
Glicerol	10% (v/v)
Tritón X-100	0,2% (v/v)
<i>Se ajusta el pH a 7.4 con HCl</i>	

Tabla 3.15. Tampón de lisis de las células.

3.3.4.3. Purificación de la proteína

Las proteínas de fusión se expresan junto a otras que se han de eliminar. Para ello se incubó el sobrenadante obtenido con la amilosa inmovilizada en una resina. La proteína a estudio junto con MBP es retenida mientras que el resto de proteínas son descartadas. Se ha utilizado el "pMAL™ Protein Fusion and Purification System" de New England Biolabs.

El proceso de purificación ha sido el siguiente:

1. Lavar las resinas de amilosa (#800-21S New England Biolabs) con el tampón de columna para equilibrarla.
2. Añadir el sobrenadante obtenido después de la ruptura celular.
3. Incubar la resina con el sobrenadante durante una hora a 4 °C con agitación.
4. Empaquetar por gravedad una columna cromatográfica con la resina de amilosa, en este momento ya se habrá unido la proteína de fusión a la resina.
5. Lavar la columna con 15 ml de tampón de columna.
6. Repetir este lavado varias veces. De esta forma se obtienen las proteínas puras.

Es importante que todo el proceso ocurra a 4 °C.

Reactivos	Concentración
Tris Base	20 mM
NaCl	200 mM
EDTA	1 mM
DTT	1 mM
<i>Se ajusta a pH 7.4 con HCl</i>	

Tabla 3.16. Tampón de columna utilizado en la purificación de las proteínas.

3.3.4.4. Corte de la proteína de fusión

La utilización del vector pMAL-c2x permite la posibilidad, una vez aislada la proteína de fusión, de separar la MBP de la proteína a estudio. Esto es posible gracias a la presencia de 4 aminoácidos existentes en el extremo C-terminal de la MBP, entre la MBP y la proteína. El Factor Xa reconoce a esta secuencia de aminoácidos y permite la separación de ambas proteínas.

El protocolo de corte empleado es el siguiente:

1. Lavar la resina que contiene la proteína de fusión con 5 ml de tampón de corte.

2. Añadir 500 µl de tampón de corte con la columna cerrada y recoger toda la disolución un tubo eppendorf.
3. Centrifugar el tubo eppendorf a 800xg durante un minuto y recuperar el pellet donde están las resinas.
4. Añadir 500 µl de tampón de corte, resuspender las resinas y centrifugar a 800xg durante un minuto. Repetir el proceso varias veces para equilibrar las resinas con el tampón de ruptura.
5. Añadir 200 µl de tampón de corte con 1 µl de Factor Xa e incubar durante 16 horas a 4 °C con agitación.
6. Centrifugar a 800xg durante 2 minutos y recuperar el sobrenadante donde se encuentra la proteína libre.

Reactivos	Concentración
Tris Base	20 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
DTT	1 mM
Glicerol	10% (v/v)
<i>Se ajusta a pH 8 con HCl</i>	

Tabla 3.17. Composición del tampón de corte.

3.3.5. MÉTODOS DE ESTUDIO DE LAS PROTEÍNAS HL-LIKE1 Y HL EXPRESADAS EN *E. coli*

A continuación se describen los métodos utilizados en la cuantificación y el estudio de las proteínas sobreexpresadas.

3.3.5.1. Cuantificación de proteínas. Método de Bradford

La cuantificación de proteínas se ha llevado a cabo con el kit "BioRad Protein Assay" derivado del método desarrollado por Bradford (Bradford, 1976). Éste se basa en la especificidad de unión del colorante azul de coomassie a las proteínas y en el viraje del color del reactivo al unirse a éstas en solución ácida. La unión de las proteínas aumenta la absorbancia de 465 a 595 nm. La absorción a 595 nm es proporcional a la concentración de proteína. Este método presenta pocas interferencias, tiene gran sensibilidad y amplios márgenes de linealidad.

Se ha de realizar siempre una recta patrón con distintas concentraciones de BSA (Bovine Serum Albumin): 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml y 30 µg/ml.

3.3.5.2. Electroforesis discontinua en geles SDS-poliacrilamida

La electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS es una técnica que permite la separación de proteínas, en función de su tamaño, y posterior identificación por comparación con un patrón de pesos moleculares. Las proteínas se disocian mediante la acción del SDS (detergente aniónico), de un agente reductor y de calor. La unión del SDS es proporcional a la masa de la proteína e independiente de su secuencia, de manera que las proteínas migrarán en función de su tamaño.

Los geles de poliacrilamida están formados por cadenas polimerizadas de acrilamida que se entrecruzan con cadenas de bisacrilamida formando mallas. La resolución de estos geles depende de la concentración de acrilamida y del grado de entrecruzamiento. Para mejorar la separación se realiza una electroforesis discontinua mediante dos geles de distinta porosidad. Las proteínas inicialmente atraviesan un gel concentrador (de tamaño de poro mayor) acumulándose en la interfase con el gel resolutivo (tamaño de poro menor). En este gel, las proteínas se separan de forma individual.

El protocolo seguido ha sido el siguiente:

1. Preparar los geles concentrador y separador cuyas composiciones se detallan en las tablas siguientes.

Reactivos	Volumen
Acrilamida-Bisacrilamida 30%	2.5 ml
Tris-HCl 1.5M pH 8,8	1.5 ml
SDS 10%	50 μ l
APS 10%	50 μ l
TEMED	2 μ l
H ₂ O	888 μ l
Volumen total	5 ml

Tabla 3.18. Composición del gel separador al 15%

Reactivos	Volumen
Acrilamida-Bisacrilamida 30%	0.33 ml
Tris-HCl 1.5M pH 8,8	0.5 ml
SDS 10%	20 μ l
APS 10%	20 μ l
TEMED	2 μ l
H ₂ O	1.13 ml
Volumen total	2 ml

Tabla 3.19. Composición del gel concentrador al 5%

- Colocar el gel completo en la cubeta de electroforesis y añadir el tampón de electroforesis de proteínas.

Reactivos	Concentración
Tris Base	25 mM
Glicina	250 mM
SDS	0.1%
<i>Se ajusta el pH a 8.3 con HCl</i>	

Tabla 3.20. Composición del tampón de electroforesis.

- Hervir las muestras durante 5 minutos con tampón de carga de proteínas (1:1, la misma cantidad de muestra que de tampón de carga).

Reactivos	Concentración
SDS	3% (v/v)
β -mercaptoetanol	15% (v/v)
Tris-HCl 0.5M pH 6.8	65 mM
Sacarosa	10% (v/v)
Azul de bromofenol	0.025% (v/v)

Tabla 3.21. Composición del tampón de carga 2X.

- Cargar las muestras y terminar de rellenar la cubeta con tampón de electroforesis.
- Correr el gel a 170 voltios hasta que el frente llegue al gel separador (unos 20 minutos).
- Aumentar el voltaje a 200 voltios y dejarlo correr durante una hora y media aproximadamente.
- Teñir el gel con azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R-250 Sigma) al 1% disuelto en ácido acético: metanol: agua (1:8:20) durante 30 minutos.
- Finalmente, desteñir el gel con una disolución de ácido acético: metanol: agua (1:8:20).

3.3.5.3. Detección inmunológica de proteínas por inmunotransferencia

Esta técnica combina la especificidad de los anticuerpos con la resolución de las técnicas electroforéticas. Las proteínas cargadas en un gel

de electroforesis son transferidas a una membrana de material sintético mediante la aplicación de un campo eléctrico perpendicular a ambos. Una vez que se tiene la proteína inmovilizada en la membrana se procede a la detección inmunológica. Para ello se incuba la membrana con el anticuerpo específico, y el complejo antígeno-anticuerpo generado se visualiza 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.

El protocolo empleado para esta técnica se describe a continuación:

1. Realizar la electroforesis SDS-PAGE con las mismas condiciones descritas en el punto 3.2.3.2.
2. Activar la membrana de PVDF Immobilon-P (Millipore) sumergiéndola en una disolución de metanol durante un minuto.
3. Equilibrar la membrana en tampón de transferencia durante 30 minutos.
4. Retirar el gel de poliacrilamida y equilibrarlo también en el tampón de transferencia durante 30 minutos.
5. Realizar la transferencia durante 90 minutos a 300 mA constantes.
6. Finalizada la transferencia retirar la membrana y lavarla durante 10 minutos con PBS-Tween dos veces.
7. Bloquear la membrana con una disolución de PBS-Tween-Leche en polvo al 7% durante 30 minutos.
8. Incubar la membrana con el anticuerpo primario específico contra la proteína a estudiar, diluido 1:500-1000 en PBS-Tween-Leche O/N a 4°C.
9. Lavar con PBS-Tween-Leche dos veces durante 10 minutos.
10. Incubar la membrana con el anticuerpo secundario diluido 1:1000 en PBS-Tween-Leche durante 2 horas a temperatura ambiente.
11. Lavar con PBS-Tween-Leche dos veces durante 10 minutos.
12. Lavar con PBS-Tween tres veces durante 10 minutos.
13. Revelar la membrana con el kit comercial "SuperSignal West Dura Extended Duration substrate" (Thermo Scientific) con exposiciones entre 5 y 15 minutos.

La composición de los tampones de transferencia, de la disolución Coomassie y del PBS se indica en las siguientes tablas.

Reactivos	Concentración
Tris Base	125 mM
Glicina	960 mM
SDS	0.5 %

Tabla 3.22. Composición del tampón de Laemmli 5X a pH 8.3.

Reactivos	Concentración
Buffer Laemmli	1X
Metanol	20 %
Agua	c.p.s 1 L

Tabla 3.23. Composición del tampón de transferencia.

Reactivos	Concentración
Metanol	40 % (v/v)
Ácido acético	5 % (v/v)
Brilliant Blue R250	1 g/l
Agua	55%

Tabla 3.24. Composición del Azul Coomasie. Solución de tinte.

Reactivos	Concentración
NaCl	137 mM
KCl	2.7 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	1.4 mM
Tween	1%

Tabla 3.25. Composición de buffer PBS-Tween 1X.

Reactivos	Concentración
PBS-Tween	1X
Leche en polvo	7%

Tabla 3.26. Composición de buffer PBS-Tween-Leche.

Los anticuerpos primarios empleados en el desarrollo de esta técnica reconocían, o bien a la proteína HL-Like1 o a la HL. El anticuerpo específico contra la proteína HL-Like1 se encargó a la empresa Abyntek Biopharma S.L. y su obtención y desarrollo se indica en detalle en el apartado 3.6 de Material y Métodos.

Referente al anticuerpo anti-HL se han empleado dos diferentes. El primero de ellos se obtuvo por el grupo del Prof. F.G. Hegardt. Se trata de un anticuerpo policlonal del cual se desconoce la secuencia antigénica. El segundo anticuerpo anti-HL se obtuvo de la casa comercial Abnova (Cat. nº. H00003155-M01). Se trata de un anticuerpo monoclonal que reconoce a la proteína completa, según las especificaciones de la casa comercial.

3.3.6. MEDIDAS DE ACTIVIDAD LIASA

A lo largo de los años la actividad liasa se ha medido de diferentes maneras, empleando radioactividad o, desde el año 1988 por medio de espectrofotometría de absorción molecular (Wanders et al., 1988).

El ensayo de actividad HMG-CoA liasa se basa en la medida del

acetoacetato producido por la enzima. El método puesto a punto por Wanders se basa en dos reacciones en cadena, donde el producto de la primera es el sustrato de la segunda.

La primera reacción está catalizada por la HMG-CoA liasa y produce acetoacetato y acetil-CoA a partir de HMG-CoA. En la segunda reacción interviene la enzima β -hidroxibutirato deshidrogenasa y transforma el acetoacetato en β -hidroxibutirato y el NADH en NAD⁺. Este último, a diferencia del primero, no absorbe la luz a 340 nm. Así, siguiendo la pérdida de absorción a 340 nm se puede ver cómo se va consumiendo el acetoacetato y, en consecuencia, cuál ha sido la actividad cinética de la enzima.

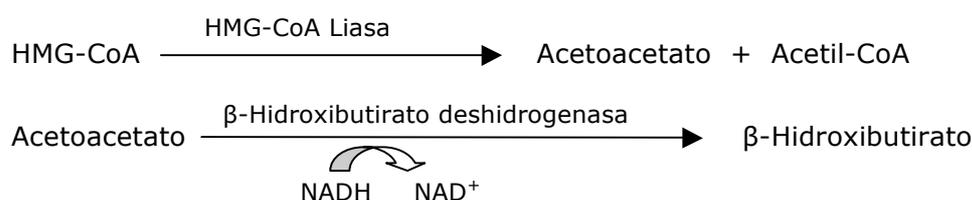


Figura 3.2 Reacciones enzimáticas que forman parte del ensayo de la actividad HMG-CoA liasa.

Este método se ha aplicado a diferentes muestras: proteínas clonadas (HL, HL-Like1 wild-type, HL-Like1 mutadas), cultivos celulares, tejidos humanos (fracción mitocondrial y citosólica) y en todos ellos hemos seguido el mismo protocolo que se describe a continuación.

3.3.6.1. Reacción acoplada de escisión del HMG-CoA en acetoacetato y acetil-CoA, y transformación del acetoacetato en β -hidroxibutirato

La reacción se basa en el protocolo descrito por Wanders et al (1988) pero en este caso, ambas reacciones se producen al mismo tiempo, una detrás de otra, en el mismo tubo de ensayo.

El protocolo seguido es el siguiente:

1. Mezclar todos los componentes de la reacción excepto el sustrato (HMG-CoA).
2. Incubar a temperatura ambiente durante diez minutos.
3. Añadir la cantidad de HMG-CoA correspondiente (concentración final entre 0-300 μ M).
4. Medir la absorbancia a 340 nm durante 20 minutos tomando como blanco la mezcla de reacción sin el HMG-CoA.

Reactivos	Concentración
DTT (1M)	12 mM
MgCl ₂ (1M)	12 mM
NADH (12.5mM)	0.2 mM
β-Hidroxibutirato deshidrogenasa (1U/ μl)	1 U
Muestra a medir actividad	5 μg
HMG-CoA (10 mM)	0-300 μM
Tris-HCl (50 mM) pH 8 ó 9	c.s.p. 500 μl

Tabla 3.27. Composición de la mezcla de reacción para la medida de la actividad HL-Like1.

La diferencia entre lo absorbido por la muestra y lo absorbido por el blanco es proporcional al número de moles de NADH que han desaparecido:

$$\Delta Abs = \epsilon \cdot l \cdot c$$

ϵ es el coeficiente de extinción molar y su valor es 6.22, l es la anchura de la cubeta (paso óptico) que vale 1 y c es la concentración.

Por lo tanto la concentración de NADH (mM) es:

$$A_{\text{blanco}} - A_{\text{muestra}} / 6.22$$

Esta concentración es proporcional a la concentración de acetoacetato que había en la muestra. Los moles de acetoacetato son:

$$\text{Moles de acetoacetato} = C_{\text{NADH}} \times 0,5 \mu\text{l}^{(1)}$$

(1) 0,5 μl es el volumen final de la reacción.

Teniendo en cuenta la dilución de la muestra, el tiempo de ensayo y la cantidad de tejido o de proteína de partida, se puede calcular la actividad específica de nuestra enzima.

3.4. Localización de variantes de *splicing* del gen *HMGCLL1*

La búsqueda de variantes fisiológicas de *splicing* del gen *HMGCLL1* se ha realizado utilizando tanto métodos bioinformáticos como experimentales.

3.4.1. BÚSQUEDA DE VARIANTES DE *SPLICING* MEDIANTE MÉTODOS BIOINFORMÁTICOS

Las técnicas bioinformáticas son herramientas que se basan en principios de comparación de secuencias. Analizan las bases de datos de estructura y/o de secuencia, tanto de DNA como de proteínas. Estos programas tienen una fuerte base experimental, ya que muchas de las reglas en las que se basan han sido establecidas de este modo. Son métodos que se empezaron a desarrollar hace tiempo, pero que en los últimos años, aprovechando el impulso de los proyectos de genómica, han tenido un auge muy importante.

3.4.1.1. Bases de datos de ESTs

Las bases de datos de ESTs (Expressed Sequence Tags) contienen información de secuencias cortas de cDNAs (de 200 a 500 pb), generadas mediante secuenciación aleatoria de clones. Estas bases suelen incluir información de origen diverso, pero sobre todo, de grupos que se dedican a la secuenciación masiva de cDNAs. Las secuencias de ESTs tienen las siguientes características:

- Suelen representar sólo el extremo 3' del gen. Los clones de cDNA se obtienen por RT-PCR de mRNA usando un oligo(dT) como primer. Normalmente esta técnica sólo asegura que el extremo 3' esté incluido en el cDNA.
- Son secuencias de calidad moderada que pueden tener errores de hasta en un 3% del total de la información.
- En principio se refieren a la secuencia de los exones, sin embargo, la contaminación esporádica con DNA genómico puede aportar información sobre los intrones del gen.

La base de datos de ESTs que se ha utilizado ha sido la de UniGene del NCBI (National Center for Biotechnology Information):

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest>

3.4.1.2. Base de datos de cDNAs completos

Existen grupos de investigación que se dedican a la secuenciación masiva de cDNAs de tejidos de distintos organismos, con el objetivo final de obtener el transcriptoma de cada uno de ellos. Estas secuencias son depositadas en bases de datos. Estas bases incluyen la información derivada de las secuenciaciones masivas y la información generada por los grupos de investigación que caracterizan genes de forma individual. Las bases de datos consultadas han sido:

- “The Mammalian Gene Collection” (Strausberg et al., 2002). Esta base de datos es el proyecto de secuenciación más ambicioso a nivel mundial para la caracterización de cDNAs completos. Se engloba dentro del NCBI y la página web donde está disponible es:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>

- Ensembl. Este proyecto ofrece las secuencias de cDNAs y genes completos de vertebrados y otras especies eucariotas. Se inició en 1999 y es una unión entre el “European Bioinformatics Institute” (EBI) y el “Wellcome Trust Sanger Institute” (WTSI). Además de las secuencias de nucleótidos también ofrece las secuencias de las proteínas que codifican. La página web donde está disponible es:

<http://www.ensembl.org/>

3.4.1.3. Búsqueda de homologías de secuencia de DNA

La búsqueda de homologías de secuencia del DNA permite un primer acercamiento a la función biológica de un nuevo gen. El programa utilizado para la búsqueda de homologías ha sido el BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de NCBI. Este programa construye un algoritmo de búsqueda de similitudes, aplicable a cualquier secuencia de DNA o proteína. Existen cinco aplicaciones distintas del programa BLAST: BLASTN, BLASTX, TBLAST, BLASTP y TBLASTN. Su página web es:

www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/

3.4.1.4. Base de datos de proteínas

La base de datos UniProt contiene información de gran calidad, comprensible y accesible sobre la secuencia de las proteínas, así como información funcional sobre las mismas. Las bases de datos de las que se nutre UniProt son: UniProt Knowledge Base (UniProtKB), UniProt Reference Clusters (UniRef) y UniProt Archive (UniParc).

Se trata de una colaboración entre el European Bioinformatics Institute (EBI), el Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) y el Protein Information Resource (PIR). EBI y SIB suelen producir Swiss-Prot y TrEMBL, mientras que PIR produce la Protein Sequence Data base (PIR-PSD). Estas dos bases coexisten con diferentes coberturas de secuencias y prioridades.

La dirección de Internet donde se encuentra esta base de datos es:

<http://www.uniprot.org>

3.4.1.5. Cálculo del grado de fortaleza de las secuencias donadoras y aceptoras de *splicing*

Para el cálculo de grado de fortaleza de las secuencias donadoras y aceptoras de *splicing*, se ha utilizado el programa "Splice Site Prediction by Neural Network" que ha sido desarrollado por el "Human Genome Informatics Group" del Lawrence Berkeley National Laboratory. Este programa se basa en el análisis de frecuencias de dinucleótidos y es realizado por dos redes neurales que trabajan independientemente (Reese et al., 1997).

El programa reconoce intrones que tienen al principio el dinucleótido GT y al final el dinucleótido AG. Cada uno de los cálculos de las posibles secuencias, tanto donadoras como aceptoras, lo realizan con un grado de fortaleza comprendido entre 0 y 1. Cuanto más cercano es el valor a 1, más fuerte es esa secuencia y más fuerte es el exón que la contiene.

Se toman 15 pares de bases para definir las secuencias donadoras de intrón y 41 pares de bases para las secuencias aceptoras de intrón. La dirección de Internet donde se encuentra es la siguiente:

http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html

3.4.2. BÚSQUEDA DE VARIANTES DE *SPLICING* POR AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS SOLAPANTES

Para la búsqueda de variantes de *splicing*, se ha utilizado una estrategia de amplificación del cDNA del gen *HMGCLL1* mediante fragmentos solapantes, a partir del cDNA de distintos tejidos y grado de desarrollo.

3.4.2.1. Diseño de primers

En primer lugar, se ha amplificado el cDNA completo del gen de la enzima HMG-CoA liasa Like 1. Para ello se han utilizado los mismos primers y condiciones de PCR de las siguientes tablas.

Reactivos	Concentración
Buffer 10X	1X
dNTPs	1mM
MgCl ₂	1.5 mM
Primers	20 pmol
cDNA	150 ng
Accu Taq polimerasa	1 U
Agua miliQ estéril	c.s.p. 50 µl

Tabla 3.28. Componentes de la reacción de PCR para obtener el cDNA del gen *HMGCLL1*.

Primer	Secuencia 5'→ 3'
LK F	CTCGCCGACTGCCGCCACAGGCTCCGCC
LK R	CCATTACTTCACATATCAGAGCAAGTTGGC

Tabla 3.29. Primers utilizados para la amplificación del cDNA del *HMGCLL1*.

	Temperatura	Tiempo	
Inicio	98 °C	2'	} 30 ciclos
Desnaturalización	96 °C	30"	
Hibridación	55-60 °C	30"	
Extensión	72 °C	1'10"	
Extensión final	72 °C	10'	

Tabla 3.30. Programa de PCR para la amplificación del cDNA del gen *HMGCLL1*.

A partir del cDNA completo del gen *HMGCLL1* se han amplificado varios fragmentos solapantes que lo exploran. Los primers empleados se indican en la tabla 3.31 y el diseño experimental se muestra en la figura 3.3.

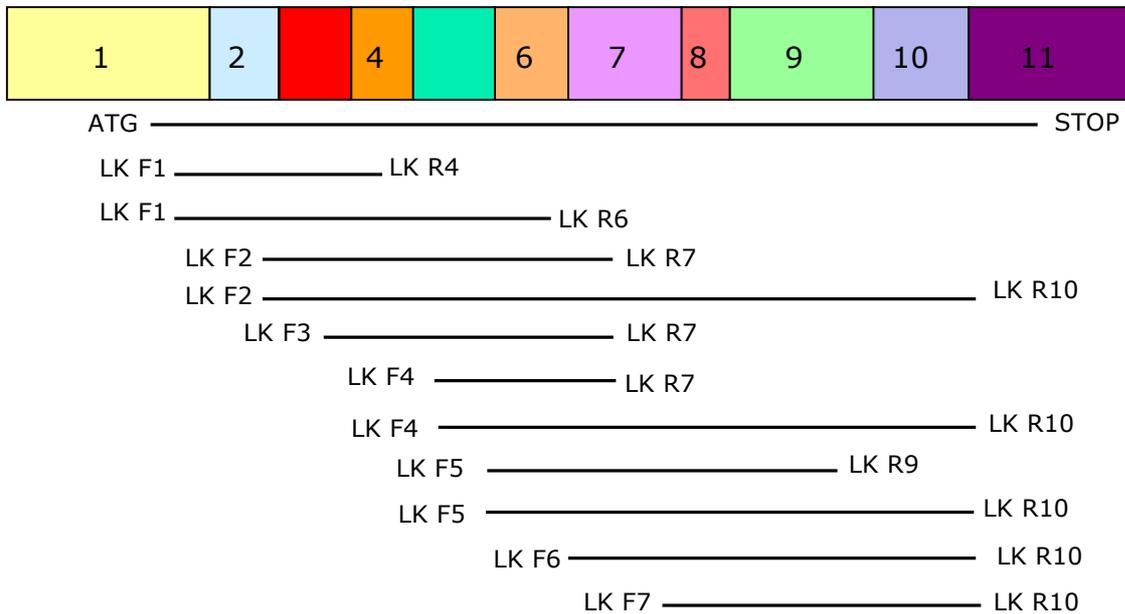


Figura 3.3. Esquema de la exploración mediante fragmentos solapantes del gen *HMGCLL1*.

Una vez amplificados los fragmentos, se han comprobado sus tamaños mediante un gel de agarosa siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.3.3.4.2.

Parejas primers	Secuencia 5'→3'	Variante A	Variante B	Variante C
LK-ATG/LK-STOP	CTCCGCCGAATTC ATG GGGATGTGCC CATAAATCCAGGAT CCT CAAGCATTG	1136 pb	1046 pb	1142 pb
LKF1/LKR4	CTTCTCCGGGAGCATCTCTG GAGTCCAGATAACTGGGATG	173 pb	83 pb	179 pb
LKF1/LKR6	CTTCTCCGGGAGCATCTCTG GGACAGGATAGCGAACTCCT	404 pb	314 pb	410 pb
LKF1/LKR7	CTTCTCCGGGAGCATCTCTG CTTGCAGACTTAACAACCTCC	559 pb	469 pb	565 pb
LKF2/LKR7	CCCGATGTCTCTGGCTTCTC CTTGCAGACTTAACAACCTCC	467 pb	-	-
LKF2/LKR10	CCCGATGTCTCTGGCTTCTC CACACCTGTATTGAGCCCCA	886 pb	-	-
LKF3/LKR7	CAGTCTGTGATGCTGATGCT CTTGCAGACTTAACAACCTCC	-	-	499 pb
LKF4/LKR7	CATCCCAGTTATCTGGACTC CTTGCAGACTTAACAACCTCC	405 pb	405 pb	405 pb
LKF4/LKR10	CATCCCAGTTATCTGGACTC CACACCTGTATTGAGCCCCA	814 pb	814 pb	814 pb
LKF5/LKR9	CCCAAAGTGGCTTGTCTGTA GTCCGTATGTGTCATGACAG	528 pb	528 pb	528 pb
LKF5/LKR10	CCCAAAGTGGCTTGTCTGTA CACACCTGTATTGAGCCCCA	692 pb	692 pb	692 pb
LKF6/LKR10	GGAGTTCGCTATCCTGTCCT CACACCTGTATTGAGCCCCA	584 pb	584 pb	584 pb
LKF7/LKR10	GGAGTTGTTAAGTCTGCAAG CACACCTGTATTGAGCCCCA	430 pb	430 pb	430 pb

Tabla 3.31. Primers utilizados en la amplificación de fragmentos solapantes del gen *HMGCLL1*.

3.4.2.2. Purificación del producto de PCR

Los fragmentos de DNA amplificados mediante PCR se han de purificar con el fin de eliminar el resto de los componentes que existen en la mezcla de reacción (primers, nucleótidos, enzimas y sales interferentes). Para ello se han utilizado diferentes métodos de purificación, que se detallan a continuación.

3.4.2.2.1. Purificación en columna

Este método se basa en la disolución del producto de PCR en una solución de elevada fuerza iónica. En esas condiciones, las moléculas de DNA con un tamaño comprendido entre 100 pb y 10 Kb se quedan adsorbidas selectivamente en la membrana de silica-gel de la columna de purificación, mientras que el resto de moléculas son eluidas. Posteriormente el DNA es lavado con un tampón que contiene etanol, y finalmente se recupera de la membrana de silica-gel mediante un eluyente de baja fuerza iónica (agua o Tris pH=8.5).

Se ha utilizado el kit "QIAquick PCR Purification" de QIAGEN siguiendo el protocolo que se detalla a continuación:

1. Añadir 5 volúmenes de buffer PB por cada volumen de producto de PCR.
2. Colocar la mezcla anterior en una columna.
3. Centrifugar la columna a 13000 rpm durante 1 minuto. Eliminar el eluido.
4. Lavar con 750 µl de Buffer PE y centrifugar a 13000 rpm durante un minuto.
5. Eliminar el eluido y volver a centrifugar uno o dos minutos en las mismas condiciones.
6. Colocar la columna en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
7. Recuperar el DNA, añadiendo 40 µl de agua y centrifugando un minuto a 13000 rpm.

3.4.2.2.2. Purificación enzimática

Se basa en las propiedades enzimáticas de dos enzimas: la Exonucleasa I, que elimina los primers que no se han consumido a lo largo de la reacción, y la Fosfatasa Alcalina de camarón que elimina los dNTPs. Este sistema permite la purificación directamente sobre el producto de PCR, de fragmentos de DNA de tamaño comprendidos entre 100 pb y 20 Kb.

El kit comercial utilizado ha sido el EXOSAP-IT (USB Corporation). Los pasos seguidos se detallan a continuación:

1. Mezclar 5 μ l de producto de PCR directamente con 2 μ l del reactivo EXOSAP-IT
2. Incubar a 37 °C durante 15 minutos para la degradación de los primers y nucleótidos.
3. Incubar a 80 °C durante 15 minutos para inactivar las enzimas del reactivo EXOSAP-IT.

3.4.2.2.3. Purificación en gel

En ocasiones es necesario eliminar no sólo los primers, nucleótidos y enzimas que no se hayan consumido durante la reacción de PCR, sino también fragmentos de DNA de distinto tamaño que acompañan al deseado. En estos casos es necesario purificar directamente desde el gel de agarosa. Para ello, en primer lugar se realiza una electroforesis para separar los distintos fragmentos por tamaños. A continuación se recorta la banda del gel que tiene el fragmento esperado y se extrae el DNA disolviendo la agarosa. Finalmente este DNA es purificado mediante columna.

El kit comercial utilizado ha sido el "QIAquick Gel Extraction" de QIAGEN. El protocolo desarrollado siguiendo las indicaciones de la casa comercial se detalla a continuación:

1. Cortar con un escalpelo el fragmento de DNA deseado del gel de agarosa.
2. Pesar el fragmento de gel y añadir 300 μ l de Buffer QG por cada 100 mg de gel.
3. Incubar a 50 °C durante 10 minutos, agitando cada 2-3 minutos, hasta la completa disolución de la agarosa. Comprobar que el color de la mezcla es amarillo. Esto indica que el pH es menor de 7.5, condición necesaria para que se adsorba el DNA a la membrana de la columna.
4. Añadir 100 μ l de isopropanol por cada 100 mg de gel y mezclar.
5. Pasar la mezcla a una columna y centrifugar a 13000 rpm durante un minuto.
6. Eliminar el eluido y añadir 500 μ l de buffer QG a la columna y centrifugar otro minuto.
7. Añadir 750 μ l de buffer PE para lavar.
8. Centrifugar a 13000 rpm durante un minuto.
9. Eliminar el eluido y volver a centrifugar otro minuto.
10. Colocar la columna en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
11. Recuperar el DNA añadiendo 40 μ l de agua y centrifugando durante un minuto.

3.4.2.2.4. Secuenciación

Para comprobar la identidad de los fragmentos de DNA obtenidos, estos se han secuenciado siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.3.3.4.4.

3.4.2.2.5. Secuenciación mediante clonaje de las variantes de *splicing* en el plásmido PCR®2.1-TOPO

Para poder secuenciar de una manera más eficiente algunas de las variantes de *splicing* encontradas, se realizó un clonaje de las mismas en el vector PCR®2.1-TOPO. Se siguió la misma metodología descrita en el siguiente apartado 3.5.1.

3.5. Localización subcelular de las proteínas HL-Like1 y HL

Para realizar la localización subcelular de la proteína HL-Like1 en cultivos eucariotas debemos clonar la secuencia del gen completa, incluyendo la de su péptido líder. La clonación se realiza en un vector de expresión en eucariotas que lleva en su secuencia la de una proteína fluorescente.

La técnica consiste, básicamente, en obtener nuestra proteína a estudio, en este caso la HL-Like1, fusionada a una proteína fluorescente. Para ello se debe clonar la HL-Like1 sin su codón de STOP, para que tanto la HL-Like1 como la proteína fluorescente se transcriban como una única proteína. Luego, el péptido líder de la HL-Like1 dirigirá a la proteína recombinante fusionada al orgánulo que corresponda, y por medio de la proteína fluorescente podremos localizarla dentro de la célula.

3.5.1. CLONACIÓN DEL cDNA DE LOS GENES *HMGCLL1* Y *HMGCL* EN EL PLÁSMIDO PCR® 2.1-TOPO

La clonación del DNA puede definirse como la recombinación *in vitro* de un fragmento de DNA (inserto) en un vector (plásmido) con capacidad de replicación autónoma. El fragmento de DNA se replicará junto con el DNA vector en la célula hospedadora y así será posible obtenerlo en un número elevado de copias. Las etapas básicas en la clonación de genes se pueden resumir en:

- Amplificación del DNA que se pretende clonar (generación del inserto).
- Digestión específica, tanto del plásmido (vector de clonación) como del inserto, con las correspondientes enzimas de restricción.

- Ligación del inserto con el vector para formar el plásmido recombinante.
- Introducción en las células receptoras del plásmido recombinante.
- Selección de colonias aisladas que porten moléculas de plásmido recombinante e identificación de los clones que contengan el DNA de interés.

La clonación de la parte codificante de los genes *HMGCL* y *HMGCLL1* se ha realizado tomando como partida al cDNA completo de ambos genes. Este cDNA se ha obtenido a través de los paneles comerciales "Human Multiple Tissue cDNA MTC Panels" (BD Biosciences).

3.5.1.1 Vectores de expresión

Vectores utilizados.

- pCR[®]2.1-TOPO (Invitrogene): es un plásmido especial para clonar productos de PCR. Permite obtener más copias de nuestro inserto a clonar en el vector final y comprobar que nuestro inserto tiene los sitios de restricción en sus extremos sin lugar a dudas (Figura 3.4).

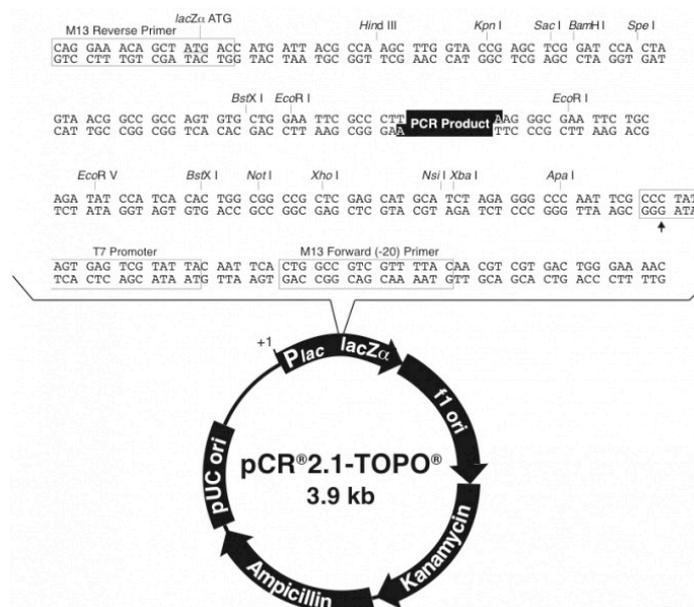


Figura 3.4. Estructura y polilinker del plásmido pCR[®]2.1-TOPO

3.5.1.2. Creación de los insertos

Para poder introducir los insertos en los vectores tienen que poseer sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción, que de forma natural no poseen. Por ello, estos insertos se han amplificado por PCR con primers específicos que llevan incorporadas las secuencias de reconocimiento de

estas enzimas de restricción.

3.5.1.2.1. Amplificación del cDNA del *HMGCLL1*

Se ha amplificado mediante PCR el cDNA del gen *HMGCLL1* a partir del cDNA de páncreas adulto "Human Multiple Tissue cDNA MTC Panels" (BD Biosciences). Para ello se han utilizado los mismos primers y condiciones de PCR de las tablas 3.28, 3.29 y 3.30.

A continuación, se ha realizado una segunda amplificación del cDNA de la enzima HL-Like1, obtenido en el paso anterior, utilizando unos primers que incorporan las secuencias de corte de enzimas de restricción HindIII y BamHI en los extremos 5' y 3' respectivamente. De esta manera amplificaremos el cDNA del gen *HMGCLL1* desde el ATG al último aminoácido codificante. Estos primers se muestran en la siguiente tabla 3.32.

Primer	Secuencia 5'→ 3'
LK HindIII F	CACAGA AAGCTT CGATGGGGAATGTGCCATC
LK BamHI R	TCAAG GGATCC AGCATTGAAGGAGGCTTG

Tabla 3.32. Primers utilizados para la amplificación del cDNA de la HL-Like1.

Los componentes de la reacción de PCR y el programa empleado son idénticos a los utilizados en las tablas 3.28 y 3.30.

3.5.1.2.2. Amplificación del cDNA del *HMGCL*

El cDNA del gen *HMGCL* humano ha sido amplificado por PCR a partir de un panel de cDNA comercial de páncreas "Human Multiple Tissue cDNA MTC Panels" (BD Bioscience). Para ello se han utilizado los primers que se indican en la tabla 3.33.

Primer	Secuencia 5'→ 3'
HL F	GGCCAAGATGGCAGCAATG
HL R	CGTAGCTCTCCACTTTCCAC

Tabla 3.33. Primers utilizados para la amplificación del cDNA del gen *HMGCL*.

El programa y las condiciones de la PCR son las mismas que las aplicadas para el gen *HMGCLL1*, recogidas en las tablas 3.28 y 3.30.

El producto de esta PCR es re-amplificado utilizando otros primers que introducirán los sitios de restricción para las enzimas EcoRI y BamHI en los

extremos 5' y 3' respectivamente. De esta manera amplificaremos el cDNA del gen *HMGCL* desde el ATG al último aminoácido codificante. Los primers se muestran en la siguiente tabla 3.34.

Primer	Secuencia 5'→ 3'
HL EcoRI F	GGCCAAGAATTCATGGCAGCAATGAG
HL BamHI R	CGGGTGGATCCAGGGACCCC

Tabla 3.34. Primers utilizados para la amplificación del cDNA de la HL.

3.5.1.3. Ligación del plásmido pCR[®]2.1-TOPO con el inserto

En esta ocasión al usar un plásmido especial para productos de PCR no es necesaria la digestión con las enzimas de restricción, ni del vector ni del inserto, para conseguir que ambos se unan.

El producto de las dos PCRs sucesivas posee adeninas protuberantes en sus extremos, adicionadas de manera "natural" por la Taq Polimerasa. Por otro lado, el vector de clonaje pCR[®]2.1-TOPO se encuentra abierto y con dos timinas en sus extremos. De esta manera, al poner en contacto el vector con el inserto, siguiendo las indicaciones de la casa comercial, podemos obtener nuestro vector recombinante.

La ligación se realizó con la siguiente mezcla de reacción.

Reactivos	Volumen
Vector pCR [®] 2.1-TOPO	1 µl
Gen <i>HMGCLL1</i>	3 µl
Solution Salt	1 µl

} 15 min
temperatura ambiente

Tabla 3.35. Componentes de la ligación del inserto con el vector.

3.5.1.4. Transformación de los vectores recombinantes HMGCLL1-pCR[®]2.1-TOPO y HMGCL-pCR[®]2.1-TOPO en *E. coli* XL1 blue

Una vez que se han construido los plásmidos recombinantes, estos se han de introducir en las células huésped para poder ser clonados. Para ello se sigue el mismo protocolo descrito en el apartado 3.2.3.3.

Sin embargo, se realiza una pequeña modificación respecto a la placa donde se siembran las células transformadas. En este caso las bacterias *E. coli* se sembraron sobre LB-Ampicilina-XTRA (50mM)-IPTG (50mM). El vector pCR[®]2.1TOPO posee su sitio de clonaje múltiple en medio del gen *LacZ*. Cuando se induce la expresión del gen *LacZ* por medio de IPTG, y se añade al

medio de cultivo XTRA (sustrato del producto del gen), las colonias adquieren una coloración azul. Esta coloración se pierde si se ha interrumpido el gen con el inserto. Las colonias positivas serán pues, las que aparezcan en color blanco, con estas colonias trabajaremos a partir de este momento, obteniendo en primer lugar el plásmido recombinante.

3.5.1.5. Selección de las colonias positivas

Las colonias blancas son las colonias positivas cuando se realiza un clonaje en pCR[®]2.1TOPO. Además del color, otra manera de comprobar si son colonias positivas o no es por medio de la PCR boiling. Para realizar esta comprobación se siguió la misma metodología descrita en el apartado 3.3.3.4.1, con los primers de las tablas 3.32 y 3.34.

3.5.2. SUBCLONAJE DE LOS GENES *HMGCLL1* Y *HMGCL* EN VECTORES DE LOCALIZACIÓN SUBCELULAR EUCARIOTA

El subclonaje es una técnica de la biología molecular, que consiste en sacar el inserto de un plásmido determinado para introducirlo en otro. Este segundo vector tiene unas características distintas que son necesarias para continuar con los experimentos. En nuestro caso es un vector de localización subcelular, que nos permitirá conocer la localización de nuestra proteína en un cultivo de células eucariotas. Las etapas del subclonaje son las siguientes:

- Digestión específica, tanto del plásmido de partida como del vector final, con las correspondientes enzimas de restricción.
- Purificación del inserto obtenido del primer plásmido.
- Ligación del inserto con el vector para formar el plásmido recombinante.
- Introducción en las células receptoras del plásmido recombinante.
- Selección de colonias aisladas que porten moléculas de plásmido recombinante e identificación de los clones que contengan el DNA de interés.

3.5.2.1. Vectores de clonaje

Vectores empleados:

- pEGFP-N3 (Clontech): es un plásmido con el cual se puede trabajar tanto en organismos procariontes como eucariotas. Cuando se trabaja en bacterias obtenemos muchas copias del vector recombinante y es el huésped idóneo para realizar el clonaje propiamente dicho. Lleva en su secuencia la de la proteína fluorescente verde, lo que nos será de gran utilidad cuando trabajemos en modelo de cultivo celular

eucariota. (Figura 3.5).

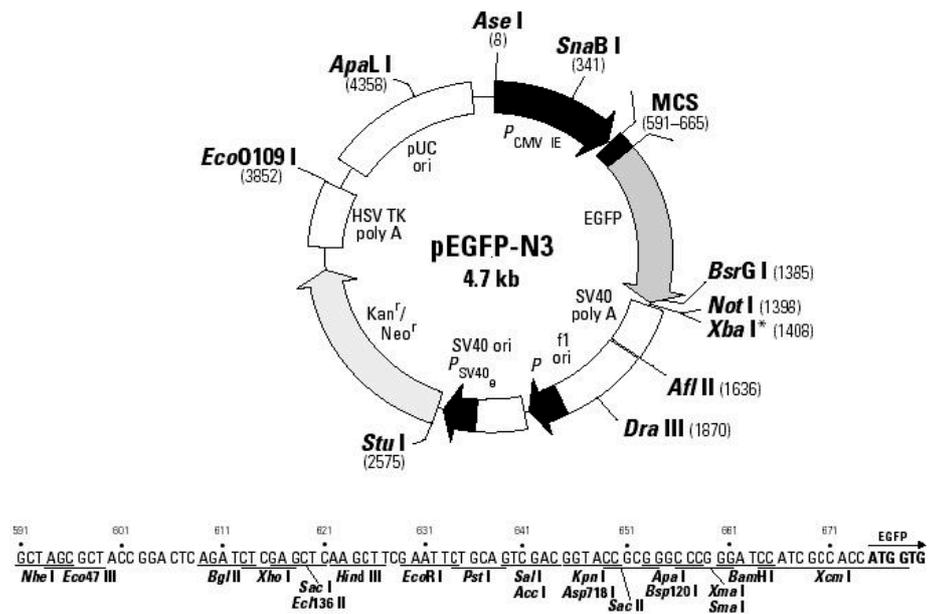


Figura 3.5. Estructura y polilinker del plásmido pEGFP-N3.

- pDsRed2-N1 (Clontech): es un plásmido con el cual se puede trabajar tanto en organismos procariontas como eucariotas. Cuando se trabaja en bacterias obtenemos muchas copias del vector recombinante y es el huésped idóneo para realizar el clonaje propiamente dicho. Lleva en su secuencia la de la proteína fluorescente roja, lo que nos será de gran utilidad cuando trabajemos en modelo de cultivo celular eucariota. (Figura 3.6).

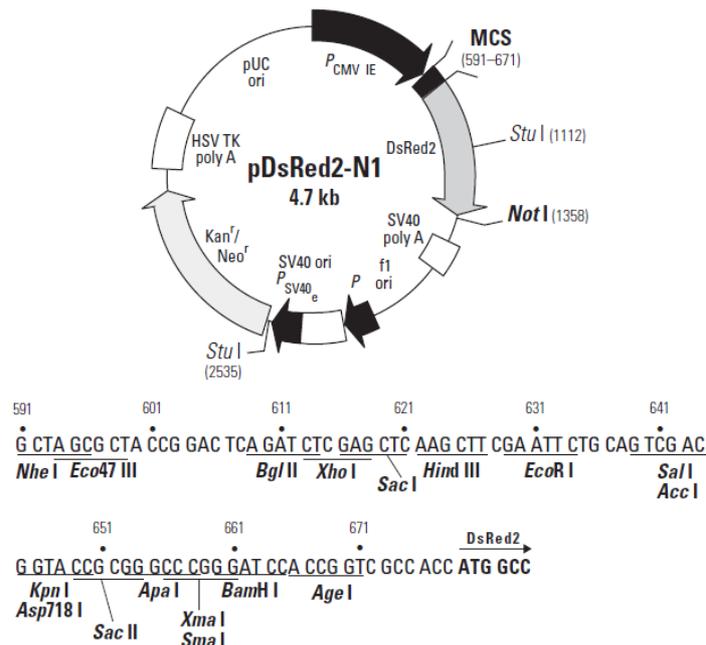


Figura 3.6. Estructura y polilinker del plásmido pDsRed2-N1.

3.5.2.2. Digestión de los vectores recombinantes HMGCLL1-pCR[®]2.1-TOPO y HMGCL-pCR[®]2.1-TOPO y del plásmido final de clonaje

Como ya hemos comentado anteriormente, los plásmidos y los insertos se han de digerir con las mismas enzimas de restricción para poder formar el plásmido recombinante.

Se han utilizado enzimas de restricción para formar los extremos cohesivos que facilitan la ligación del inserto con el vector. Previamente se ha comprobado que las enzimas utilizadas no cortan a lo largo de la secuencia de cDNA de los genes *HMGCLL1* y *HMGCL*.

Tanto los plásmidos como los insertos se digieren con las correspondientes enzimas de restricción durante tres horas a 37 °C. Las cantidades añadidas se recogen en la tabla 3.36. Se siguió el protocolo descrito por la casa comercial.

Reactivos	Volumen
Buffer 10X	5 µl
DNA (~ 300 ng/ µl)	10 µl
Enzima I	1 µl
Enzima II	1 µl
Agua	c.p.s. 50 µl

Tabla 3.36. Componentes de la digestión del inserto y el vector con las enzimas de restricción.

3.5.2.3. Purificación del inserto

Para la purificación del inserto obtenido tras la digestión del plásmido de partida realizaremos los siguientes pasos:

1. Electroforesis en un gel de agarosa para separar por tamaño el plásmido y el vector digeridos.
2. Purificación desde el gel de agarosa siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.4.2.2.3.

3.5.2.4. Ligación del vector e inserto digeridos

El siguiente paso en el proceso de clonaje es la unión entre el inserto y el vector. Ambos ya deben estar digeridos por las correspondientes enzimas de restricción y poseer extremos cohesivos compatibles.

La enzima T4 DNA Ligasa se encarga de formar los enlaces covalentes entre los extremos cohesivos, originando una sola molécula de DNA a partir de dos (plásmido + inserto).

Se utilizó el kit comercial de la enzima T4 DNA Ligasa (BioLabs) y se

siguieron las indicaciones de la casa comercial para realizar la ligación, que se indican a continuación:

Reactivos	Volumen
Buffer 2X	10 μ l
Vector	2 μ l
Inserto	5-7 μ l
T4 DNA Ligasa	1 μ l
Agua	c.p.s. 20 μ l

} 5 minutos
25 °C

Tabla 3.37. Componentes de la ligación del inserto y el vector.

A partir de este paso se realizó la transformación de los plásmidos recombinantes y la selección de las colonias positivas siguiendo la misma metodología descrita en los apartados 3.3.3.3 y 3.3.3.4.

3.5.3. CULTIVO DE CÉLULAS EUCARIOTAS HEK293

Los vectores empleados sirven para conocer la localización subcelular de las proteínas HL-Like1 y HL en cultivos celulares eucariotas. Por esta razón, el siguiente paso consistió en pasar a trabajar con líneas celulares eucariotas, como son las HEK293.

Las células de HEK293 se deben mantener para su crecimiento a 37 °C y atmósfera de 5% CO₂, en un medio de cultivo que posee los componentes indicados en la siguiente tabla:

Reactivos	Concentración
DMEM	1 X
FCS inactivado por calor	10 %
L-Glutamina	4 mM
Penicilina	100 U/ml
Estreptomicina	100 μ g/ml

Tabla 3.38. Componentes del medio de cultivo para las células eucariotas.

3.5.3.1. Tratamiento de los cover-slips (cs)

Los cover-slips (cs) son unos cristales sobre los que queremos que crezcan las células HEK293, pero para que esto ocurra debemos realizar un tratamiento previo, lo cual permitirá crear una capa de poli-D-lisina sobre ellos que hará que las células se puedan adherir a ellos y crecer sobre los mismos.

El protocolo a seguir es el siguiente:

1. Tratar los cover-slips limpios con una solución de ácido nítrico durante 24 horas.
2. Lavarlos con agua destilada.
3. Realizar dos lavados con agua mili-Q de una hora cada uno.
4. Lavar con etanol 70% durante una hora.
5. Lavar con etanol 90% durante 18-24 horas.
6. Conservarlos en etanol absoluto.
7. Tratar los cover-slips con una solución de poli-D-lisina 100 µg/ml (concentración final) a 37 °C durante toda la noche.

3.5.4. TRANSFECCIÓN DE LAS CÉLULAS EUCARIOTAS CON LOS VECTORES RECOMBINANTES

La transfección consiste en la introducción de DNA exógeno en una célula eucariota. Al ser las membranas celulares eucariotas más complejas que las procariotas, los métodos para introducir DNA exógeno dentro de éstas son más elaborados. Las estrategias utilizadas para este propósito son varias y se clasifican según sean químicas o físicas.

Nosotros utilizamos el método químico de los liposomas para lo cual utilizamos el kit de la casa comercial METAFECTENE™PRO (Biontexas). El protocolo empleado se describe a continuación:

1. Sembrar las células sobre los cover-slips hasta que lleguen a una confluencia del 70-80%. En las placas de 12 pocillos se recomienda sembrar entre $1-4 \times 10^5$ células, sin embargo esta cantidad varía dependiendo del tamaño del pocillo o placa donde se siembren las mismas.
2. Realizar las siguientes mezclas de reacción:
 - Solución A: 0.5-1.5 µg de DNA en 50 µl de medio DMEM libre de suero y antibióticos.
 - Solución B: 1-6 µl del reactivo METAFECTENE en 50 µl de medio DMEM libre de suero y antibióticos.
3. Combinar ambas soluciones e incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
4. Añadir la mezcla de reacción sobre las células. Si la mezcla puede resultar tóxica para las células, cambiar el medio de cultivo de las mismas pasadas 4-6 horas. Incubar las células a 37 °C al 5% CO₂.

Se realizaron diferentes combinaciones de plásmidos para transfectar en una misma placa de cultivo de células HEK293. De esta manera se pudo localizar en una misma célula dos proteínas al mismo tiempo, lo que facilita

la interpretación de los resultados. Las combinaciones de plásmidos fueron las siguientes:

- HMGCLL1-pEGFP / HMGCL-pDsRed2
- HMGCLL1-pEGFP / ER-pDsRed2 (Clontech). Este plásmido comercial lleva en su secuencia la de la proteína calreticulina que es específica de retículo endoplasmático, además de la proteína fluorescente roja.

3.5.5. FIJACIÓN DE LAS CÉLULAS A LOS COVER-SLIPS

Para la visualización al microscopio de las células transfectadas es necesario fijarlas al soporte donde han crecido. El proceso de fijación las matará y dejará ancladas firmemente a la superficie del cover slip.

Existen varios métodos de fijación, nosotros utilizamos el descrito a continuación:

1. Una vez transcurridas 48-72 horas desde la transfección, eliminar el medio de cultivo.
2. Lavar con 500 μ l de PBS 1X.
3. Añadir 500 μ l paraformaldehído (PFA) 4% disuelto en PBS 1X e incubar 15 minutos a temperatura ambiente.
4. Eliminar el PFA 4% y lavar dos veces con 500 μ l PBS 1X.
5. Montar los cs sobre portas con 7-10 μ l Mowiol (aceite que permite que los cs queden adheridos a los portas y que no interfiere en la fluorescencia de las proteínas).

Reactivos	Concentración
NaCl	1.35 M
KCl	27 mM
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	100 mM
KH ₂ PO ₄	18 mM
<i>Ajustar con NaOH a pH 7.4</i>	

Tabla 3.39. Composición del tampón PBS 10X.

3.5.6. INMUNOLocalIZACIÓN DEL PEROXISOMA EN CÉLULAS TRANSFECTADAS CON EL VECTOR RECOMBINANTE HMGCLL1-pEGFP

La inmunolocalización consiste en la detección por medio de anticuerpos específicos de un determinado orgánulo de la célula. Después, este anticuerpo primario será detectado por otro secundario, que está

marcado con un fluoróforo, lo que permitirá su localización dentro de la célula.

En nuestro caso utilizamos esta técnica para estudiar la posible co-localización de la proteína HL-Like1 con el peroxisoma, ya que no se disponían de plásmidos comerciales que llevase en su secuencia la de una proteína específica de peroxisoma unida a otra proteína fluorescente, como ocurría en el caso del retículo endoplasmático.

El protocolo seguido es el siguiente:

1. Después de fijar las células a los cover slips, lavar con PBS-Gly durante 10 minutos.
2. Permeabilizar con PBS-Tritón 1% durante 10 minutos.
3. Lavar con PBS-Gly 10 minutos.
4. Bloquear con PBS-Gly-BSA-Tritón 1% durante 20 minutos.
5. Incubar 1 hora 37 °C con el anticuerpo primario (dilución 1:300 PBS-Gly-BSA-Tritón 0.2%) (Rabbit monoclonal antibody anti-PMP70 (Zymed)).
6. Lavar con PBS-Gly durante 5 minutos.
7. Incubar 1h 37 °C con el anticuerpo secundario (dilución 1:500 PBS-Gly-BSA-Tritón 0.2%) (goat anti-rabbit Alexafluor 568 (Molecular Probes)).
8. Lavar con PBS 1X durante 10-15 minutos.
9. Dejar secar 15-30 minutos.
10. Montar el cover-slip sobre un porta con mowiol.

Las disoluciones empleadas se indican en las siguientes tablas.

Reactivos	Concentración
PBS	1X
Glicina	20 mM

Tabla 3.40. Composición del buffer PBS-Gly.

Reactivos	Concentración
PBS	1X
Tritón X-100	1 % (v/v)

Tabla 3.41. Composición del buffer PBS-Tritón.

Reactivos	Concentración
PBS	1X
Glicina	20 mM
Tritón X-100	1 % ó 0.2 % (v/v)
BSA	1% (p/v)

Tabla 3.42. Composición del buffer PBS-Gly-BSA-Tritón.

3.5.7. VISUALIZACIÓN AL MICROSCOPIO CONFOCAL DE FLUORESCENCIA

Los microscopios confocales son capaces de obtener una imagen tridimensional de la muestra y hacer distintos cortes de la misma para poder visualizar la muestra por capas. Esta característica es muy útil en experimentos de colocalización de dos proteínas, como es nuestro caso.

Las muestras obtenidas, una vez fijadas a los cover-slips, fueron visualizadas con un microscopio confocal Leica en los Servicios Científico Técnico de la Universidad de Barcelona. Las imágenes obtenidas se analizaron con el programa Photoshop 5.0.

3.5.8. ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN-DISOCIACIÓN DE LA PROTEÍNA HL-LIKE1 A LA MEMBRANA DEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

En un primer paso nuestro propósito es conocer si la proteína HL-Like1 es una proteína de membrana. Si resulta que sí lo es, el segundo paso a realizar consiste en averiguar si es una proteína integral o periférica.

Existen distintas metodologías para conseguir este propósito. Algunas son más agresivas y consiguen la total ruptura de las membranas con lo que todas las proteínas que se encuentren integradas en ella, tanto periférica como integralmente, se separarán de las membranas. En nuestro caso someteremos a las membranas a un tratamiento suave con lo cual sólo conseguiremos separar de la membrana a aquellas proteínas que sean periféricas.

3.5.8.1. Fraccionamiento subcelular

El fraccionamiento subcelular es un conjunto de métodos y técnicas que tienen como objetivo obtener fracciones puras o enriquecidas en un determinado componente celular, ya sea éste un orgánulo (mitocondrias, núcleos, peroxisomas, etc), una fracción de membrana (membrana total, plasmática, dominio basolateral, dominio apical,...), complejos multiproteicos (citoesqueleto de actina, microtúbulos, poros nucleares,..).

En nuestro caso, hemos realizado esta técnica en diferentes momentos durante la realización de esta tesis doctoral, así como para diferentes objetivos. Las muestras obtenidas se han empleado para realizar medidas de actividad liasa (apartado 3.2.6), experimentos de western-blot (apartado 3.2.5.3) o experimentos de asociación/disociación de proteínas a membranas.

El protocolo seguido fue el siguiente:

1. Tomar aproximadamente 1-2 gr del tejido a estudiar y

homogeneizarlo con tres volúmenes de buffer de lisis.

Reactivos	Concentración
Tris-HCl	10 mM
Sacarosa	250 mM
MgCl ₂	5 mM
DTT	1 mM
PMSF	1 mM
<i>Ajustar con NaOH a pH 7.4</i>	

Tabla 3.43. Composición del tampón de lisis.

2. Centrifugar 1000xg 10 minutos a 4 °C. Quedarnos con el sobrenadante.
3. Centrifugar a 30000xg 30 minutos a 4 °C. El pellet corresponde a las mitocondrias y el sobrenadante a la fracción citosólica. Quedarnos con el sobrenadante.
4. Centrifugar la fracción del sobrenadante a 100000xg a 4 °C durante 1 hora. El pellet obtenido será el retículo endoplasmático.

Todas las fracciones subcelulares se guardaron a -80 °C hasta su uso.

3.5.8.2. Asociación de la proteína HL-Like1 a la membrana de retículo

Este experimento nos permitirá conocer si la proteína HL-Like1 es una proteína de membrana y si es capaz, por sí sola, de asociarse a la membrana del retículo endoplasmático. La metodología utilizada se basa en la separación en dos fases (soluble y membrana). Esto se produce en las muestras tras un tratamiento con tritón X-114 (Casale et al., 2001).

Como muestras de partida se tomaron a la proteína HL-Like1 clonada, obtenida siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.2.4, y las membranas de retículo endoplasmático de pulmón humano adulto obtenidas tras el fraccionamiento subcelular.

El protocolo seguido fue el siguiente:

1. Tratar la proteína HL-Like1, la fracción de retículo y la combinación de ambas con los reactivos de la tabla 3.45.
2. Incubar en hielo durante 30 minutos y agitar cada 10 minutos.
3. Poner a 37° C durante 5 minutos.
4. Centrifugar a 10000 rpm 3 minutos para separar la parte membranosa de la soluble.
5. Realizar un western-blot de las dos fracciones obtenidas con el

tratamiento, siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.2.5.3, empleando como anticuerpo primario a aquél que reconoce a la proteína HL-Like1 de manera específica.

Reactivos	Concentración
KCl	27 mM
NaCl	1350 mM
Tris	250 mM

Tabla 3.44. Composición del buffer TBS 1X.

Reactivos	Concentración
TBS	1 X
NaCl	3 M
Tritón X-114	25 % (v/v)

Tabla 3.45. Relación de reactivos para la separación en fase soluble y membranosa del retículo endoplasmático.

3.5.8.3. Disociación de la membrana

Este experimento nos permitirá conocer si la HL-Like1 es una proteína periférica o integral de membrana de retículo. El tratamiento al que van a ser sometidas las membranas del retículo endoplasmático no es lo suficientemente agresivo como para que las proteínas integrales de membrana sean capaces de separarse de la misma. Al no producirse una solubilización completa de las membranas sólo son capaces de "separarse" de la misma las proteínas periféricas.

Partimos de la fracción de retículo endoplasmático obtenida del fraccionamiento celular al cual le realizamos el siguiente protocolo:

1. Mezclar una fracción de retículo con 2 ml de NaHCO_3 100 mM pH 11.5 y otra con 2 ml de urea 6 M pH 7.2.
2. Incubar a 37 °C durante 20 minutos.
3. Centrifugar a 100000xg 20 minutos a 4 °C y guardar el sobrenadante.
4. Lavar el pellet una vez con TBS 1X.
5. Resuspender el pellet en 500 µl de TBS 1X.
6. Tomar 500 µl del pellet resuspendido, agregarlos en tubos de Kahn y llevar a 2.5 ml con 2 ml de acetona
7. Incubar 15 minutos en hielo.
8. Centrifugar a 10000 rpm durante 10 minutos. Resuspender el pellet en 500 µl de TBS 1X.
9. Realizar un western-blot de las dos fracciones obtenidas con el tratamiento, siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.2.3.3, empleando como anticuerpo primario a aquél que reconoce a la proteína HL-Like1 de manera específica.

3.6. Estudio comparativo de las enzimas HL-Like1 y HL

A pesar de existir diferentes estudios sobre las características cinéticas de la enzima HL y de una primera aproximación a las constantes cinéticas de la HL-Like1, realizada por Sebastián Menao Guillén en el desarrollo de su tesis doctoral, nos propusimos caracterizar más en profundidad estas constantes.

Además también quisimos conocer otros parámetros relativos a su función enzimática, como son los distintos niveles de actividad de las enzimas HL-Like1 y HL por tejidos.

Para ello se siguieron diferentes metodologías que se describen a continuación.

3.6.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS CONSTANTES CINÉTICAS DE LAS ENZIMAS HL-LIKE1 Y HL

Esta caracterización se realizó tomando como muestra tanto a las proteínas HL-Like1 y HL clonadas, como a las fracciones citosólica + retículo endoplasmático y mitocondrial de testículo humano adulto.

3.6.1.1. Medidas de actividad de las proteínas HL-Like1 y HL clonadas

Tomando como partida a los plásmidos HL-Like1-pMAL-c2x y HL-pMAL-c2x, se indujo la expresión, obtención y purificación de las proteínas HL-Like1 y HL siguiendo la misma metodología descrita en el apartado 3.3.4.

Una vez obtenidas las proteínas clonadas se realizaron las medidas de actividad de las mismas a diferentes pHs de trabajo. Para ello se siguió el protocolo descrito en el apartado 3.2.6.

Para determinar la velocidad máxima de una reacción enzimática, la concentración de sustrato se aumenta progresivamente hasta alcanzar una velocidad constante de formación de producto. En ese momento el centro activo de la enzima está saturado con el sustrato y es cuando se alcanza la velocidad máxima (V_{max}) de la enzima.

Con concentraciones crecientes de sustrato $[S]$, la enzima se va acercando asintóticamente a su velocidad máxima V_{max} , pero nunca la alcanza. Por esta razón, no hay una concentración de sustrato determinada para la V_{max} . Así, el parámetro característico de la enzima está definido por la concentración de sustrato a la cual se alcanza la mitad de la velocidad máxima ($V_{max}/2$), denominado constante de Michaelis-Menten o K_m .

Por tanto, representando los valores de concentración de sustrato y

velocidad (eje de ordenadas: actividad cinética, eje de abcisas: concentración de sustrato), podemos calcular los valores de K_m y V_{max} . La V_{max} será el valor de actividad en el cual la enzima se satura, y la K_m será el valor de concentración de sustrato en el que la enzima alcanza la mitad de su V_{max} .

Otra manera de obtener estos valores es mediante la representación de los dobles recíprocos o de Lineweaver-Burk. En ella se representan los inversos de la concentración (eje abcisas) frente al inverso de la actividad enzimática (eje ordenadas). El corte de la línea que trazan los puntos con el eje de abcisas muestra el valor $-1/K_m$, y el corte con el eje de ordenadas el valor $1/V_{max}$.

3.6.1.2. Medidas de actividad liasa en las fracciones citosólica y mitocondrial de testículo humano adulto

Para la realización de este objetivo lo primero se obtuvieron las fracciones citosólica y mitocondrial de testículo humano adulto. Para ello se siguió la misma metodología descrita en el apartado 3.5.8.1.

Una vez obtenidas las dos fracciones se realizaron las medidas de actividad liasa de las mismas a diferentes pHs de trabajo. Para ello se siguió el protocolo descrito en el apartado 3.3.6.

3.6.2. SOBREENPRESIÓN DE LAS ENZIMAS HL-LIKE1 Y HL EN CULTIVOS CELULARES Y MEDICIÓN DE SU ACTIVIDAD

Teniendo en cuenta que a las proteínas clonadas y sobreexpresadas les falta su péptido líder, nos propusimos medir la actividad liasa de la proteína HL-Like1 entera en cultivos celulares. De esta manera, también se pusieron a punto las líneas celulares, que pudiesen servir como material de partida para futuros estudios funcionales de la enzima HL-Like1. Para ello se realizaron los siguientes experimentos.

3.6.2.1. Clonaje de las proteínas HL-Like1 y HL en un vector de expresión eucariota

Aunque la obtención de la proteína HL-Like1 por parte de *E. coli* es muy útil, en ocasiones necesitamos que sea un modelo eucariota el que sobreexpresa a nuestra proteína a estudio. Por esta razón realizamos el clonaje en el plásmido comercial pIRES2-EGFP (Clontech), el cual está indicado para la sobreexpresión de proteínas en cultivos eucariotas.

Seguimos la misma metodología que la descrita en los apartados 3.5.1 y 3.5.2 pero cambiando el vector de clonaje final y los primers empleados.

3.6.2.1.1. Vectores de expresión

Vectores utilizados.

- pIRES2-EGFP (Clontech): es un vector que contiene los sitios internos de entrada al ribosoma (IRES; 1, 2) del virus de la encefalomiocarditis entre el sitio de clonaje múltiple y la región codificante de la proteína fluorescente verde. Esto permite que ambos genes, el clonado dentro del MCS y el gen de la EGFP, sean transcritos en forma de un único mRNA bicistrónico. Este vector está diseñado para la transfección transitoria en células eucariotas que expresarán la proteína EGFP y la de estudio.

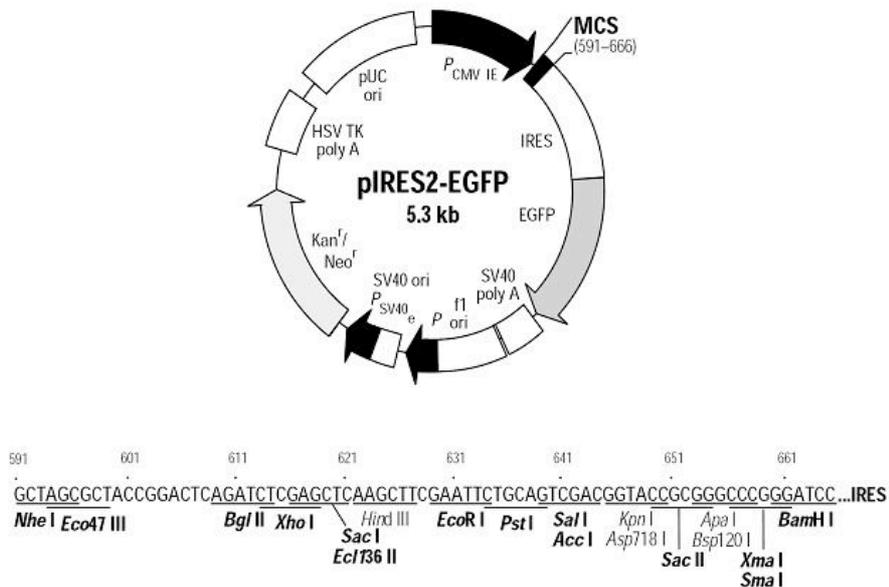


Figura 3.7. Estructura y del polilinker del plásmido pIRES2-EGFP.

3.6.2.1.2. Creación de los insertos

Los primers utilizados para la creación de los insertos de las proteínas HL-Like1 y HL se recogen en las siguientes tablas.

Primer	Secuencia 5'→ 3'
LK EcoRI F	CTCCGCCGAATTCATGGGGATGTGCC
LK BamHI R	CATAAATCCAGGATCCTCAAGCATTG

Tabla 3.46. Primers utilizados para la amplificación del cDNA de la HL-Like1.

Primer	Secuencia 5'→ 3'
HL EcoRI F	GGCCAAGAATTCATGGCAGCAATGAG
HL BamHI R	GTGGGCAGGATCCTCAGAGTTTACAGGTAG

Tabla 3.47. Primers utilizados para la amplificación del cDNA de la HL.

La mezcla y el programa de PCR son los mismos que los descritos en las tablas 3.28 y 3.30.

3.6.2.2. Transfección de los plásmidos recombinantes en un cultivo eucariota

Para ello se siguió la misma metodología descrita en el apartado 3.4.4. En este caso sólo se transfectó un vector recombinante por placa de cultivo. Los vectores a transfectar fueron:

- HL-Like1-pIRES2
- HL-pIRES2
- pIRES2 (vacío)

3.6.2.3. Lisis y fraccionamiento subcelular de los cultivos eucariotas

Una vez producida la transfección de los plásmido recombinantes, se realiza un fraccionamiento subcelular de los mismos, para obtener distintas fracciones subcelulares con las que seguir los experimentos.

El protocolo seguido fue el siguiente:

1. Recoger las células en 1 ml de PBS 1X frío.
2. Centrifugar a 5000 rpm durante 5 min y eliminar el sobrenadante.
3. Mezclar las células con 200 µl buffer lisis celular y resuspender bien. A partir de aquí se siguen dos protocolos diferentes en dependencia de lo que se quiera realizar.
4. a) Medidas de actividad: centrifugar a 10000 rpm durante 10 min a 4 °C. Guardar el sobrenadante para realizar las medidas de actividad.
b) Western-blot: se realizan centrifugaciones seriadas igual que las indicadas en el apartado 3.5.8.1.

La composición del buffer de lisis se indica en la siguiente tabla.

Reactivo	Concentración	Reactivo	Concentración
NaCl	150 mM	SAF	1 X
NaF	30 mM	PMSF	100 µg/ml
EDTA	5 mM	Tritón X-100	1.5%
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	15 mM		
Sodio pirofosfato	15 mM		
HEPES	20 mM		
<i>Ajustar a pH 7.2 con NaOH</i>			

Tabla 3.48. Composición del buffer SAF 5X.

Tabla 3.49. Buffer de lisis del cultivo celular eucariota.

3.6.2.4. Medidas de actividad

Se realizaron medidas de actividad liasa de los cultivos celulares transfectados siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.2.6.

3.6.3. MEDIDAS DE ACTIVIDAD LIASA EN TEJIDOS HUMANOS

Se realizaron medidas de actividad liasa de distintas fracciones subcelulares de diferentes tejidos humanos. Para ello se realizaron los siguientes pasos.

3.6.3.1. Fraccionamiento subcelular

Se siguió la misma metodología descrita en el apartado 3.5.8.1 hasta la obtención de la fracción citosólica y mitocondrial de todos los tejidos a estudiar.

El fraccionamiento subcelular se realizó sobre los siguientes tejidos adultos: hígado, páncreas, pulmón, testículo, músculo esquelético, riñón y cerebro.

3.6.3.2. Medidas de actividad

Se realizaron medidas de actividad liasa de las diferentes fracciones subcelulares de los tejidos humanos siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.2.6.

3.7. Obtención de un anticuerpo específico contra la proteína HL-Like1

Los primeros experimentos que requerían anticuerpos se realizaron con un anticuerpo que reconocía a la HL y también a la HL-Like1. Se trataba de un anticuerpo obtenido de manera tradicional, mediante la inoculación de conejos con la proteína HL entera, y que fue suministrado por el laboratorio del Prof. F.G. Hegardt. Se trataba de un anticuerpo policlonal desarrollado en conejo del cual se desconocía la secuencia o secuencias específicas de reconocimiento. Es por esta razón que este anticuerpo era capaz de reconocer a ambas proteínas, HL y HL-Like1, ya que las dos eran muy similares en su estructura y secuencia de aminoácidos.

Sin embargo, si queríamos seguir realizando experimentos en los cuales distinguiéramos a ambas proteínas era necesario el desarrollo de anticuerpos que no presentaran reactividad cruzada entre ambas proteínas.

El desarrollo de un anticuerpo específico contra la proteína HL-Like1 se

realizó por la empresa Abyntek Biopharma S.L. y se llevaron a cabo los siguientes pasos para su obtención.

3.7.1. SELECCIÓN DE LA SECUENCIA INMUNOGÉNICA

Teniendo en cuenta la gran homología existente entre ambas proteínas se seleccionaron dos secuencias de la proteína HL-Like1 en donde la similitud entre la HL-Like1 y la HL era menor. La elección de estas secuencias se realizó con la ayuda y colaboración del Prof. Paulino Gómez Puertas.

Las secuencias propuestas fueron:

- NH₂-GIHQYPGVRY-COOH, que comprende los aminoácidos 109 a 119 de la proteína HL-Like1.
- NH₂-SMGKFEEVVK SARHMN-COOH, que comprende los aminoácidos 161 a 176 de la proteína HL-Like1.

Finalmente se eligió la segunda de ellas para la realización del anticuerpo, según las recomendaciones de la casa comercial, añadiendo el aminoácido cisteína en el extremo amino terminal. Por lo tanto, la secuencia aminoacídica final que se utilizó para la obtención del anticuerpo fue:

NH₂-CSMGKFEEVVK SARHMN-COOH.

En la figura 3.8 se observa el alineamiento entre la secuencia inmunogénica de la HL-Like1 y la HL.

HL-Like1	161	SMGKFEEVVK SARHMN
HL	146	SFQRFDAILKAAQSAN
		* .*. ..*.*. *

Figura 3.8. Alineamiento de la HL y HL-Like1 humanas de la secuencia empleada como epítipo en el desarrollo del anticuerpo. En asterisco "*" se señalan los aminoácidos idénticos y con un punto "." los similares.

3.7.2. OBTENCIÓN DEL PÉPTIDO A INMUNIZAR

El péptido a inmunizar se obtuvo por medio de un sintetizador químico, de forma automática, por parte de la casa comercial Abyntek Biopharma S.L.

3.7.3. INMUNIZACIÓN DE LOS CONEJOS

El proceso de producción de anticuerpos policlonales es relativamente sencillo, consisten en inmunizar al animal para que su sistema inmunológico responda frente al antígeno produciendo anticuerpos contra la molécula inyectada. Sin embargo, esta producción depende de un sistema biológico

complejo y los resultados no son predecibles. Los animales responden de manera distinta generando anticuerpos diferentes contra la molécula inyectada, incluso cuando poseen la misma identidad genética.

Para todo este proceso se emplearon dos conejos blancos de la raza New Zealand. Los pasos seguidos para la inmunización de los conejos fueron los siguientes:

- Día 0.
1ª inmunización: inyección subcutánea de 200 µg de antígeno con adyuvante completo de Freund.
- Día 28.
2ª inmunización: inyección subcutánea de 100 µg de antígeno con adyuvante incompleto de Freund.
- Día 42.
3ª inmunización: inyección subcutánea de 100 µg de antígeno con adyuvante incompleto de Freund.
- Día 52.
Primer sangrado: 50 ml de sangre de cada conejo.
4ª inmunización: inyección subcutánea de 100 µg de antígeno con adyuvante incompleto de Freund.
- Día 62.
Sangrado final: 30-50 ml de sangre de cada conejo.

3.7.4. PURIFICACIÓN DE LOS ANTICUERPOS

La purificación se llevó a cabo por cromatografía de afinidad con el antígeno por parte de la casa comercial.

3.7.5. COMPROBACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DEL ANTICUERPO

Para comprobar si el anticuerpo desarrollado era específico para la proteína HL-Like1 se realizaron las siguientes pruebas.

3.7.5.1. Comprobación del uso del anticuerpo con la proteína HL-Like1 clonada

Tomando como partida a los plásmidos HL-Like1-pMAL-c2x y HL-pMAL-c2x, se indujo la expresión, obtención y purificación de las proteínas HL-Like1 y HL siguiendo la misma metodología descrita en el apartado 3.2.4.

Una vez obtenidas las proteínas clonadas se realizó un western-blot

con las mismas, empleando como anticuerpo primario el obtenido de la casa comercial. Para ello se siguió el protocolo descrito en el apartado 3.3.5.3.

3.7.5.2. Comprobación del uso del anticuerpo sobre cultivos celulares

Tomando como partida cultivos celulares HEK293, se comprobó la utilidad del anticuerpo para conocer el nivel de proteína HL-Like1 endógena de los cultivos.

Para ello se siguió la metodología descrita en los apartados 3.5.3, 3.5.5 y 3.5.6 en cuanto al cultivo celular, fijación de las células sobre los cover-slips e inmunofluorescencia. En este caso el anticuerpo primario que se empleó fue el obtenido para la proteína HL-Like1.

3.7.6. NIVEL DE EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA HL-LIKE1 EN TEJIDOS HUMANOS

El objetivo final de este apartado consistía en conocer cuál era el nivel de expresión de la proteína HL-Like1 en diferentes tejidos humanos, de manera específica y sin reactividad cruzada con la enzima HL.

Una vez que se había comprobado que el anticuerpo era específico para la proteína HL-Like1 se pasó a testar su utilidad en tejidos humanos. Para ello se realizaron las siguientes metodologías.

3.7.6.1. Western-blot sobre la membrana comercial de tejidos adultos humanos

Se tomó como material de partida a la membrana de la casa comercial ProSci "Human Normal Tissue Blot II", la cual tenía transferidos en cada una de sus calles 15 µg de un homogenado total de los siguientes tejidos: cerebro, corazón, riñón, hígado, pulmón, páncreas, músculo esquelético, piel y bazo.

Se siguió la metodología descrita en apartado 3.3.5.3 a partir del bloqueo de la membrana.

3.7.6.2. Western-blot sobre un homogenado de tejidos fetales humanos

Se realizó un homogenado de los diferentes tejidos fetales obtenidos a través del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Clínico "Lozano Blesa". No se hizo ningún fraccionamiento subcelular de los tejidos ya que la cantidad que se tenía de los mismos era mínima.

Se siguió la misma metodología descrita en el apartado 3.3.5.3 utilizando como anticuerpo primario el que es específico para la proteína HL-Like1.

3.8. Estudio de la interacción entre las proteínas HL-Like1 y tubulina

Este estudio se planteó en vista de que la HL-Like1 tenía una localización extra-mitocondrial y que la tubulina era capaz de regular, aunque de manera indirecta, la actividad de la HMG-CoA Reductasa. Teniendo en cuenta que ambas enzimas utilizaban el mismo sustrato, se quiso comprobar si la tubulina podía afectar de alguna manera a la HL-Like1.

Para conseguir este objetivo se llevaron a cabo diferentes experimentos que trataron de confirmar si existía interacción entre la tubulina y la HL-Like1, si esta interacción afectaba a la actividad de la enzima y la parte de la estructura de la proteína que intervenía.

En primer lugar se obtuvieron la tubulina y la proteína HL-Like1. Después, se realizaron diferentes clonajes en los que se deletionaba parte de las proteínas HL-Like1 y HL, para identificar la posible zona de interacción entre las proteínas HL-Like1 y tubulina, y HL y tubulina.

3.8.1. OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE TUBULINA A PARTIR DE CEREBRO DE RATA

La obtención de la HL-Like1 clonada se obtuvo siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.3.4, y la obtención de la tubulina se indica a continuación.

3.8.1.1. Obtención de tubulina acetilada

El protocolo seguido se describe a continuación. Todas las acciones se realizan a 4 °C o en baño de hielo:

1. Tomar un cerebro de rata y homogeneizar 15 veces en buffer MES (tabla 3.50) en una proporción de 1 g cerebro por cada 0.8 ml buffer.
2. Centrifugar a 50000xg durante 45 minutos a 4 °C.
3. Tomar el sobrenadante y adicionar glicerol (40% del volumen total). Poner a 37 °C durante 20 min.
4. Centrifugar a 50000xg durante 30 minutos a 37 °C. (Eliminar el sobrenadante y guardar el precipitado a -80 °C hasta 6 meses).

5. Resuspender en buffer MES (en el menor volumen posible aproximadamente 500 μ l) e incubar a 4 °C 30 min.
6. Centrifugar a 50000xg durante 15 minutos a 4 °C. Descartar el precipitado.

Reactivos	Concentración
MES	0.1 M
MgSO ₄	1 mM
<i>Se ajusta el pH a 6.8 con NaOH</i>	

Tabla 3.50. Composición del tampón MES de homogeneización.

3.8.1.2. Preparación de la columna de fosfocelulosa

El protocolo consta de dos partes, la primera de precipitación de la fosfocelulosa y la segunda de preparación de la columna propiamente dicha.

El protocolo es el siguiente:

1. Precipitación de la fosfocelulosa:
 - Hidratar la fosfocelulosa con HCl 5 N.
 - Lavar con agua hasta alcanzar el pH 7.
 - Adicionar NaOH 5 N.
 - Lavar con agua hasta alcanzar el pH 7.
2. Preparación de la columna:
 - Preparar el montaje de la columna y tomar 500 μ l fosfocelulosa.
 - Dejar que se compacte.
 - Lavar con dos veces con 7 ml MES

3.8.1.3. Purificación de la tubulina

El protocolo es el siguiente:

1. Añadir a la tubulina 300 μ l de MES.
2. Cargar la tubulina a la columna y esperar a que entre en ella completamente.
3. Recoger la tubulina en fracciones de 500 μ l.
4. Medir la concentración de tubulina siguiendo el método de Bradford.

3.8.2. INMUNOPRECIPITACIÓN DE LOS COMPLEJOS HL-LIKE1-TUBULINA Y HL-TUBULINA

La inmunoprecipitación es una técnica básica de la biología molecular que consiste en la separación, por medio de anticuerpos específicos inmovilizados en una columna, de una proteína específica. También sirve para comprobar si dos proteínas interactúan entre sí en determinadas condiciones, tanto *in vivo* como *in vitro*.

Básicamente, la técnica consiste en poner en contacto a las proteínas a estudio (ya sean proteínas clonadas o que se encuentren en un extracto celular) y luego pasar esa mezcla por una columna en la que previamente, hemos inmovilizado un anticuerpo capaz de reconocer a una de ellas. Después de recoger la parte retenida en la columna se realiza un western-blot utilizando un anticuerpo que reconozca a la otra proteína. Si se produce interacción aparecerá una marca en el western-blot.

Las fases de la técnica consisten en: preparación de la columna de sepharosa, diálisis del anticuerpo para su posterior unión a la columna e inmunoprecipitación del complejo propiamente dicho. El protocolo seguido en todas estas etapas se detalla a continuación.

3.8.2.1. Preparación de la sepharosa

La sepharosa es una resina que es capaz de adherir el anticuerpo de interés tras un tratamiento sobre la misma, el cual se detalla a continuación:

1. Pesar la sepharosa, aproximadamente unos 150 mg. La concentración final de la misma va a ser 0.3 g/ml.
2. Solubilizar la sepharosa en 1 ml de HCl 1 mM.
3. Colocar la sepharosa en una columna, pasar 4 ml de HCl 1 mM y luego 1 ml de HCl 0.1 mM.
4. Eluir con HCl 0.1 mM.
5. Retirar la sepharosa y guardarla en un eppendorf, debe quedar líquido para que no se seque.
6. Guardar a 4 °C si no se va a usar en el momento.

3.8.2.2. Diálisis del anticuerpo

Los anticuerpos que se quieran adherir a la sepharosa se deben dializar. Para ello se realiza el siguiente protocolo:

1. Colocar 30 µl del anticuerpo a dializar (concentración final 1 mg/ml por cada ml de sepharosa) sobre el tape de un eppendorf.
2. Cubrir el volumen de anticuerpo con agua hasta formar una "muesca".

3. Colocar la membrana de diálisis sobre el eppendorf y cerrarlo.
4. Introducir el eppendorf en la disolución de diálisis, de manera que quede en la mitad del líquido.
5. Dejar en agitación a 4 °C durante 16 horas.

Reactivos	Concentración
HNaCO ₃	0.1 M
NaCl	0.5 M

Tabla 3.51. Composición de la disolución de diálisis.

3.8.2.3. Unión de la sepharosa con el anticuerpo dializado

Una vez preparados los elementos para la inmunoprecipitación por separado se realiza la unión de los mismos. El proceso a seguir es el siguiente:

1. Mezclar la sepharosa con el anticuerpo dializado e incubarlos a temperatura ambiente con agitación suave durante dos horas.
2. Dividir el volumen de sepharosa en dos partes de 1/3 y 2/3, las cuales se tratarán de manera diferente a partir de este momento.
 - 1/3: agregar un volumen igual de glicina 0.05 M pH 8. Esta muestra servirá como control negativo de la inmunoprecipitación.
 - 2/3: agregar el anticuerpo dializado.
3. Centrifugar a 10000 rpm durante un minuto.
4. Lavar tres veces con partes iguales de glicina 0.05 M pH 8.
5. Lavar una vez con PBS 1X.
6. Resuspender la sepharosa-Anticuerpo en 700 µl de PBS 1X y la sepharosa-Glicina en 300 µl de PBS 1X.

Cuando hayamos terminado todo este proceso ya estaremos en disposición de comenzar el protocolo de inmunoprecipitación propiamente dicho, ya que todas estas etapas eran meramente preparatorias.

3.8.2.4. Inmunoprecipitación del complejo

En este momento tenemos 700 µl de sepharosa-anticuerpo y 300 µl de sepharosa-glicina. Para que el experimento sea comparable realizamos el siguiente protocolo.

1. Tomar 80 µl de sepharosa-anticuerpo para cada mezcla de la

reacción.

2. Descartar el sobrenadante.
3. Realizar el mismo procedimiento con la sepharosa-glicina.
4. Adicionar a cada tubo el volumen de MES necesario para cada mezcla de reacción.
5. Realizar por separado la mezcla HL-Like1-Tubulina y HL-Tubulina.
6. Mezclar con las resinas contenidas en el buffer MES.
7. Incubar dos horas con agitación a temperatura ambiente.
8. Lavar dos veces con 200 μ l de MES.
9. Descartar el sobrenadante y guardar a -20 °C.
10. Realizar un western-blot de las diferentes mezclas revelando con el anticuerpo primario anti-DM1A, que reconoce a la tubulina, en el caso de haber unido a la sepharosa el anticuerpo anti-HL, que reconoce a la tubulina. Revelaremos con el anticuerpo primario anti-HL cuando hayamos unido a la sepharosa al anticuerpo anti-DM1A. Para ello seguimos la metodología descrita en el apartado 3.2.5.3.

3.8.3. CLONACIÓN DE LAS PROTEÍNAS HL-LIKE1 Y HL CON Y SIN SU HÉLICE α -12 Y ESTUDIO DE SU INTERACCIÓN CON LA TUBULINA

Para el estudio de la interacción entre la proteína HL-Like1 y la tubulina se realizaron una serie de clonajes para obtener la proteína sin los aminoácidos que codifican la hélice α 12 de su estructura. Los programas bioinformáticos nos indicaban que, de producirse la interacción entre ambas proteínas, lo más probable es que ésta se produjese por esa zona de la proteína HL-Like1.

Teniendo en cuenta la gran homología que existe entre las proteínas HL-Like1 y HL, también realizamos el clonaje sin la hélice α 12 de la HL.

Seguimos la metodología descrita en los apartados 3.5.1 y 3.5.2, pero en este caso el plásmido final de clonaje fue el pMAL-c4x. Los primers utilizados para la realización de este clonaje también fueron diferentes en algunos apartados.

3.8.3.1. Vectores de expresión

Vectores utilizados.

- pMAL-c4x (New England Biolabs): es un vector diseñado para la expresión de proteínas en forma de fusión al extremo C-terminal de

la MBP (Maltosa Binding Protein) de *E. coli*, que tiene una gran afinidad por la amilosa. El gen que codifica para la MBP está unido al polilinker por medio de una zona de reconocimiento para el Factor Xa. Esto permite separar la proteína de fusión después de la purificación.

pMAL-c4X Polylinker:

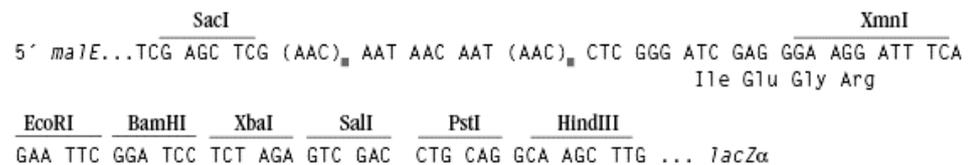


Figura 3.8. Estructura del polilinker del plásmido pMAL-c4x.

3.8.3.2. Creación de los insertos

Los primers utilizados para la creación de los insertos de las proteínas HL-Like1 y HL sin su hélice α 12, así como de la proteína HL-Like1 sin sus últimos 6 y 3 aminoácidos, se recogen en las siguientes tablas.

Primer	Secuencia 5' → 3'
LK EcoRI F no hélice α -12	CTCCGCC GAATTC ATGGGGATGTGC
LK BamHI R no hélice α -12	GAGGCTTGG GATCC ATTAAGAGTTTG
LK EcoRI F no 6 aa	CTCCGC GAATTC ATGGGGATGTGCC
LK BamHI R no 6 aa	GCATTGA AGGATCC ATTATGCTAC
LK EcoRI F no 3 aa	CTCCGCC GAATTC ATGGGGATGTGC
LK BamHI R no 3 aa	CAAGTC AGGATCC ATTAGGAGGCT

Tabla 3.52. Primers utilizados para la amplificación del cDNA de la HL-Like1 sin la hélice α 12 y sin sus últimos 3 y 6 aminoácidos.

Primer	Secuencia 5' → 3'
HL EcoRI F no hélice α -12	GGCCA GAATTC ATGGCAGCATAG
HL BamHI R no hélice α -12	GTAGCCTGG GATCC ATTAGGAGCTAG

Tabla 3.53. Primers utilizados para la amplificación del cDNA de la HL sin la hélice α 12.

La mezcla y el programa de PCR son los mismos que los indicados en las tablas 3.28 y 3.30.

3.8.3.3. Obtención de las enzimas HL-Like1 y HL sin su hélice $\alpha 12$

Se siguió la misma metodología descrita en el apartado 3.2.4 para la sobreexpresión de las proteínas HL-Like1 y HL delecionadas.

3.8.3.4. Influencia de la tubulina en la actividad de las enzimas HL-Like1 y HL

Se realizaron medidas de actividad siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.3.6 pero a la mezcla de reacción se le añadieron cantidades crecientes de tubulina obtenida a partir del cerebro de rata.

RESULTADOS

RESULTADOS

4.1. Comprobación de la homología estructural entre las proteínas HL-Like1 y HL

Algunas de las mutaciones, encontradas en pacientes con aciduria 3-hidroxi-3-metilglutárica, que cursan con pérdida de actividad de la enzima HL, se reprodujeron en la proteína HL-Like1. De esta forma, se comprobaba si la afectación de la actividad enzimática era similar y si existía una homología estructural y funcional entre ambas proteínas.

4.1.1. MODELO TRIDIMENSIONAL DE LA HL-LIKE1

El modelo de estructura para la HL-Like1 se realizó por homología de secuencias, utilizando como molde la estructura cristalizada de la HL humana (Fu et al., 2006). La homología entre ambas resultó ser del 67%.

En la figura 4.1 se muestra el alineamiento de secuencias entre las enzimas HL-Like1 y HL.

A partir de este alineamiento se pudo construir el modelo 3D de la proteína HL-Like1. La superposición de las estructuras de las proteínas HL-Like1 y HL se muestra en la siguiente figura 4.2. En ella se puede observar la gran homología estructural existente entre ambas enzimas.

HL-LIKE1	43						GLPEFV
HL	28						TLPKRV
							** *
HL-LIKE1	49	KIVEVGPRDG	LQNEKVIVPT	DIKIEFINRL	SQTGLSVIEV	TSFVSSRWVP	
HL	34	KIVEVGPRDG	LQNEKNIVST	PVKIKLIDML	SEAGLSVIET	TSFVSPKWVP	
		*****	**** *	.* *	*.* *	*.* *	*****
HL-LIKE1		ssssshhhhh	h	h	hhhhhhhhhh	hhh	sss
HL		sssss	hh h	h	hhhhhhhhhh	hhh	sss
HL-LIKE1	99	QMADHTEVMK	GIHQYPGVRY	PVLTPNLQGF	HHAVAAGATE	ISVFGAASES	
HL	84	QMGDHTVLK	GIQKFPGINY	PVLTPNLKGF	EAAVAAGAKE	VVIFGAASEL	
		. *	*.* *	***** *	***** *	*.* *	*.* *
HL-LIKE1		hhhhh	h	ss ssss	hhhh	hhhhh	s ssssss hh
HL		hhhhh	h	ss ssss	hhhh	hhhhh	ss ssssss hh
HL-LIKE1	149	FSKKNINCSI	EESMGKFEEV	VKSARHMNIP	ARGYVSCALG	CPYEGSITPQ	
HL	134	FTKKNINCSI	EESFQRFDAI	LKAAQSANIS	VRGYVSCALG	CPYEGKISPA	
		. *	*** *	.* *	.* *	*** *	***** *
HL-LIKE1		hhhh	h	hhhhhhhhhh	hhhhh	s ssssss	hh
HL		hhhh	h	hhhhhhhhhh	hhhhh	s ssssss	hh
HL-LIKE1	199	KVTEVSKRLY	GMGCYEISLG	DTIGVGTPGS	MKRMLESVMK	EIPPGALAVH	
HL	184	KVAEVTKKFY	SMGCYEISLG	DTIGVGTPGI	MKDMLSAVMQ	EVPLAALAVH	
		. *	*.* *	***** *	***** *	*.* *	*.* *
HL-LIKE1		hhhhhhhhhh	hh	sssss s	hhh	hhhhhhhhhh	h sssss
HL		hhhhhhhhhh	h	sssss s	hhh	hhhhhhhhhh	h sssss
HL-LIKE1	249	CHDTYGQALA	NILTALQMG	NVDSAVSGL	GGCPYAKGAS	GNVATEDLIY	
HL	234	CHDTYGQALA	NTLMALQMG	SVVDSSVAGL	GGCPYAQGAS	GNLATEDLVY	
		*****	* * *****	*.* *	***** *	***** *	*.* *
HL-LIKE1			hhh	hhhhhhhh	sssss		hhhhh
HL		ss	hhh	hhhhhhhh	sssss		hhhhh

Figura 4.1. Alineamiento de las secuencias de las proteínas HL-Like1 y HL, donde se observa una gran homología entre ambas estructuras. En asterisco "*" se señalan los aminoácidos idénticos y con punto "." los similares. Los aminoácidos pertenecientes a algún elemento de estructura secundaria se indican con "h" si son componentes de una hélice alfa y con "s" si forman parte de una lámina beta.

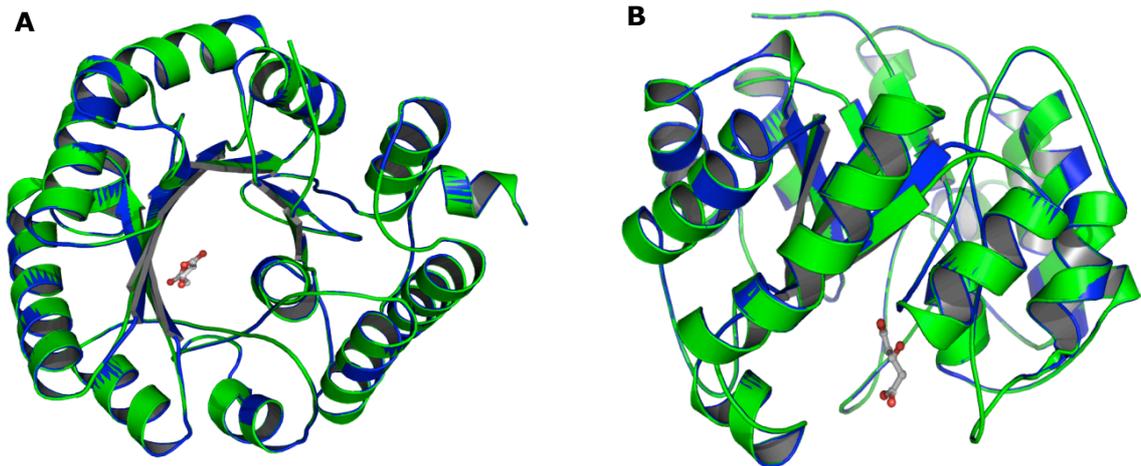


Figura 4.2. Superposición de las estructuras de las proteínas HL-Like1 (verde) y HL (azul). A. Vista superior. B. Vista lateral.

4.1.2. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA PARA CONFIRMAR LA HOMOLOGÍA ESTRUCTURAL DE LAS PROTEÍNAS HL-LIKE1 Y HL

Se diseñaron tres mutantes distintos para la proteína HL-Like1: R56Q, L207S y H248R. La mutagénesis de cada uno de ellos se realizó a partir del plásmido HL-Like1-pMAL-c2x obtenido en la tesis de Sebastián Menao Guillén (2006). Tras la transformación, en la cepa XL1Blue de *E. coli*, del producto de la reacción de mutagénesis, se aisló el DNA plasmídico y la presencia de las mutaciones se comprobó mediante secuenciación.

4.1.2.1. R56Q

Para realizar este cambio de aminoácido se mutó el codón AGG de la arginina 56 por CAG que codifica un glutámico. El resultado de la secuenciación se indica en la figura 4.3.

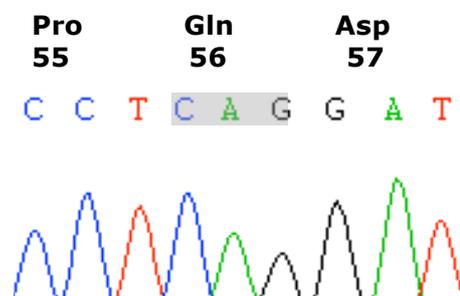


Figura 4.3. Secuencia en forward del plásmido HL-Like1-pMAL-c2x con la mutación R56Q.

4.1.2.2. L207S

Para realizar este cambio de aminoácido se mutó el codón TTG de la leucina 207 por TCG que codifica una serina. El resultado de la secuenciación se indica en la figura 4.4.

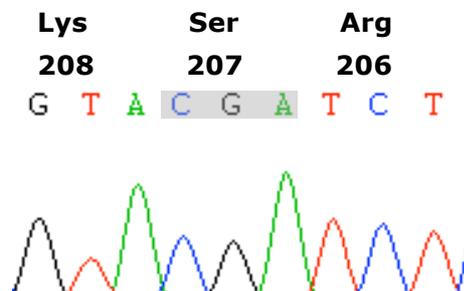


Figura 4.4. Secuencia en reverse del plásmido HL-Like1-pMAL-c2x con la mutación L207S.

4.1.2.3. H248R

Para realizar este cambio de aminoácido se mutó el codón CAC de la histidina 246 por CGC que codifica una arginina. El resultado de la secuenciación se indica en la figura 4.5.

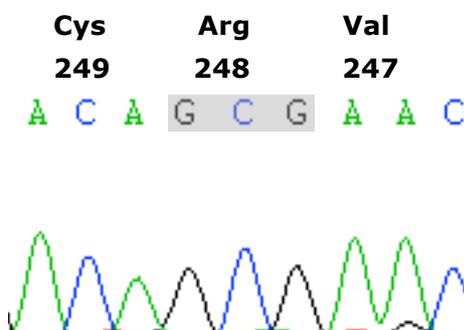


Figura 4.5. Secuencia en reverse del plásmido HL-Like1-pMAL-c2x con la mutación H248R.

4.1.3. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS MUTADAS PARA EL ESTUDIO DE ACTIVIDAD

Las células BL21 Codon Plus (DE3)-RIPL fueron transformadas con los plásmidos que contenían las mutaciones R56Q, L207S y H248R. Se indujo la expresión a 20 °C, con una concentración de IPTG de 0.2 mM, a una DO_{595nm} entre 0.8 y 1. En la figura 4.4 se muestra el resultado del western-blot de la proteína wild-type junto con las tres mutantes. Los niveles de expresión

fueron comprobados en tres clones distintos de cada construcción, obteniéndose en todos los casos el mismo resultado.

La sobreexpresión fue mucho mayor en la proteína wild-type (salvaje) que en las mutadas. Este mayor nivel de expresión de la proteína wild-type respecto a las mutadas puede deberse a que la mutación introducida provoca un plegamiento incorrecto de la proteína o aumenta su inestabilidad, por lo que la cantidad final obtenida es menor.

Se realizaron medidas de densitometría de las bandas obtenidas en el western-blot. Se tomó el valor de la proteína HL-Like1 wild-type como referencia (100%) y se calcularon los valores para las proteínas mutadas. El mutante R56Q se expresó un 7% respecto a la WT, el L207S un 30% y el H248R un 22%.

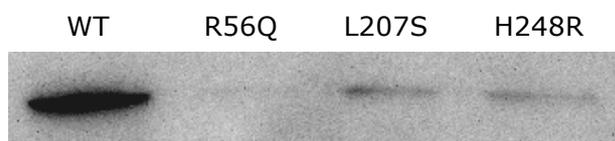


Figura 4.6. Western-blot de las proteínas HL-Like1 wild-type y mutadas.

4.1.4. MEDIDAS DE ACTIVIDAD DE LAS PROTEÍNAS MUTADAS

Se realizaron los ensayos de actividad enzimática de la proteína salvaje y de las tres proteínas mutantes. Tal y como se indica en la tabla 4.1, pudo medirse de forma fiable y reproducible la actividad de la proteína HL-Like1 wild-type, pero no se midió actividad liasa en ninguna de las proteínas mutadas.

Proteína	Actividad enzimática (nmol / min*mg)
HL-Like1	25
R56Q (HL-Like1)	n.d.
L207S (HL-Like1)	n.d.
H248R (HL-Like1)	n.d.

Tabla 4.1. Resultados de la medida de actividad en la proteína HL-Like1 wild-type y en los mutantes diseñados para comprobar la similitud estructural de la proteína HL-Like1 y HL (n.d. no detectable).

4.1.5. LOCALIZACIÓN DE LAS MUTACIONES DE LA HL-LIKE1 EN LA ESTRUCTURA 3D DE LA ENZIMA

A continuación se muestran los resultados de localización de las mutaciones creadas dentro de la estructura de la proteína HL-Like1. Se señalan también los aminoácidos con los que interaccionan los aminoácidos mutados.

4.1.5.1. Variante R56Q

La mutación p.R41Q de la HL es la más frecuente en los pacientes con aciduria 3-hidroxi-3-metilglutárica (Mitchell et al., 1998 (b); Ozand et al., 1991). El aminoácido Arg⁵⁶ de la proteína HL-Like1 equivale según modelado a la Arg⁴¹ de la enzima HL. Este aminoácido se encuentra localizado en la interacción del sustrato con el centro activo. El estudio 3D sugiere que el cambio de tamaño y, sobre todo, de carga de la arginina no permite una correcta interacción del sustrato con el resto de aminoácidos del centro activo, e impide así la actividad enzimática.

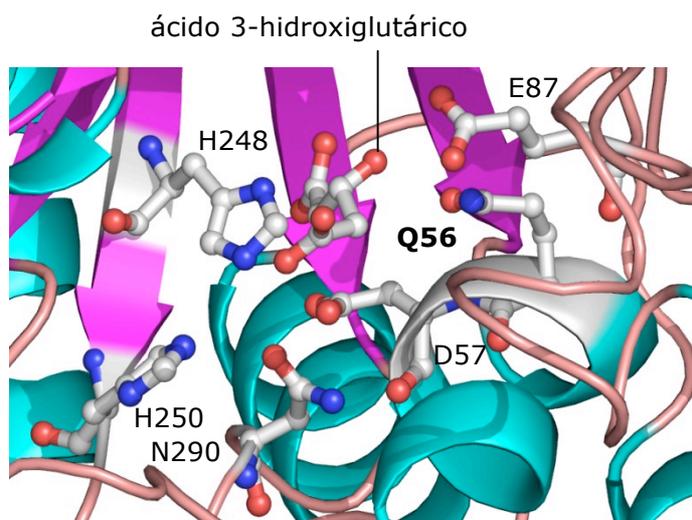


Figura 4.7. Localización del aminoácido Q56 en la estructura 3D de la HL-Like1.

4.1.5.2. Variante L207S

La Leu²⁰⁷ de la HL-Like1 está rodeada de una serie de aminoácidos hidrofóbicos (Val¹⁴¹, Gly¹⁴³, Met¹⁶², Phe¹⁶⁵, Gly¹⁸¹, Val¹⁸³, Val²⁰³, Iso²¹⁵) que conforman un *cluster* que da estabilidad al centro activo. El cambio a serina introduce un aminoácido polar que probablemente distorsiona la estructura local, afectando a la conformación del centro activo.

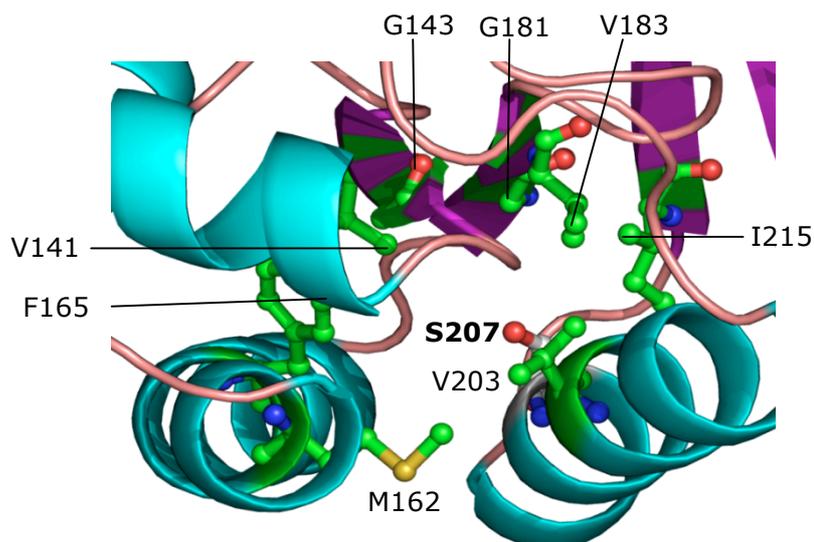


Figura 4.8. Localización del aminoácido L207 en la estructura 3D de la HL-Like1.

La mutación de su aminoácido homólogo en la HL (p.F192S), co-descubierta por el Dr. Sebastián Menao Guillén y la doctoranda, también provoca la pérdida de actividad total de la enzima (Menao et al., 2009), por un mecanismo parecido al descrito para la HL-Like1, ya que también forma parte de un cluster apolar que estabiliza el centro activo de la HL.

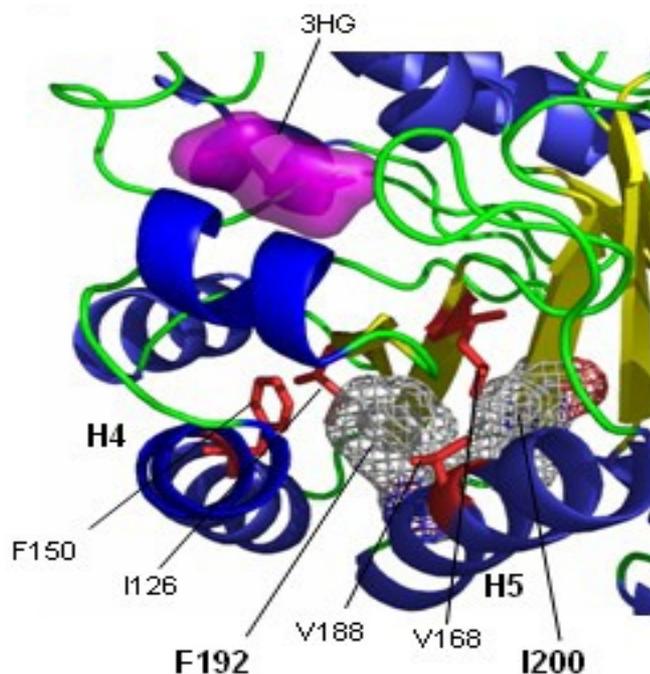


Figura 4.9. Área que rodea a la mutación missense p.F192S de la HL. Se localizan también al ácido 3-hidroxiglutarico y a los residuos del mismo cluster hidrofóbico (I126, F150, V168 y V 188).

4.1.5.3. Variante H248R

El aminoácido histidina 248 se encuentra en el centro catalítico de la enzima, y está implicado en la unión con el catión divalente Mg^{+2} . El cambio por arginina impediría que se produjese esta unión correctamente debido a las diferencias que existen entre ambos aminoácidos. El aminoácido homólogo His²³³ de la HL también está implicado en la unión con el catión divalente y su cambio produce la pérdida total de actividad enzimática (Roberts et al., 1996).

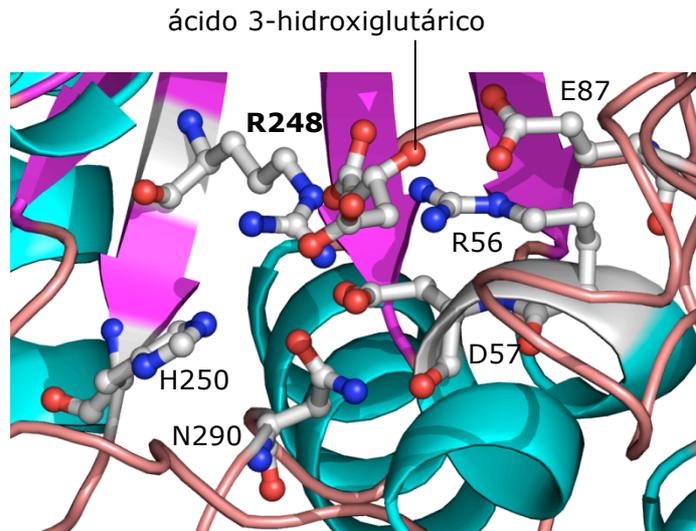


Figura 4.10. Localización del aminoácido R248 en la estructura 3D de la HL-Like1.

4.2. Localización de las variantes de *splicing* fisiológicas del gen *HMGCLL1*

La localización de variantes de *splicing* del gen *HMGCLL1* se realizó utilizando dos métodos distintos: uno bioinformático, de aproximación, basado en la consulta de bases de datos de cDNAs completos y de ESTs, y otro experimental basado en la amplificación de fragmentos solapantes y redundantes del cDNA del gen *HMGCLL1*.

4.2.1. ANÁLISIS DE LAS BASES DE DATOS DE TRÁNSCRITOS COMPLETOS Y DE PROTEÍNAS

Existen discrepancias entre las diferentes bases de datos analizadas, las cuales se centran sobre todo en el número de transcritos encontrados y en la cantidad de variantes que codifican. Estas diferencias se muestran a continuación.

4.2.1.1. Base de datos NCBI-Gene

En la base de datos NCBI-Gene aparecen dos transcritos que se corresponden con las variantes a y b del gen *HMGCLL1*. La "variante a" está codificada por 10 exones, con un tamaño de 2518 pares de bases. El número de acceso en el GenBank es el NM_019036.2.

La "variante b" está codificada por 9 exones, con un tamaño de 2481 pares de bases, y su número de acceso en el GenBank es el NM_001042406.1. Ésta fue la primera variante reportada por las bases de datos.

La diferencia entre ambas variantes radica en que la "variante a" posee un exón más, el exón 2, que no está presente en la "variante b".

4.2.1.2. Base de datos Ensembl

En la base de datos Ensembl aparecen hasta 10 transcritos diferentes, sin embargo, sólo dos de ellos serían capaces de llegar a formar proteínas completas según la propia base de datos. Estos transcritos se corresponden con las variantes "a y b" de la base de datos NCBI-Gene.

También aparece un tercer transcrito que según la base de datos Uniprot (comentada a continuación) correspondería con la "variante c" de la proteína HL-Like1.

El resto de transcritos parecen haberse formado por deleciones de algunos exones del gen, dando lugar a cDNAs que podrían producir proteínas de diferentes tamaños. La presencia de estas probables proteínas no se ha demostrado experimentalmente. Los transcritos alternativos encontrados coinciden con los localizados en la base de datos de ESTs (resultados comentados a continuación).

Estas variantes de *splicing* corresponden a la "variante b" del gen. Los exones que se delecionan son: 6, 6 y 7, 6 a 8 y 6 a 9. También aparecen tres variantes más en las que encontramos parte de intrones o que sólo incluyen a los últimos exones del gen.

4.2.1.3. Base de datos UniProt

Esta base de datos no recoge secuencias de cDNA o DNA de genes, sino que se basa en clasificar las proteínas que son capaces de transcribirse a partir del material genómico. En ella hemos encontrado tres variantes de la proteína, con tamaños diferentes.

La primera de ellas es la "variante a" que codifica para una proteína de 370 aminoácidos. Su mRNA se corresponde con el de las "variantes a" de las bases de datos NCBI-Gene y Ensembl. Sin embargo, no confirman la existencia de esta variante a nivel de proteína sino que lo infieren por la

existencia del mRNA que la traduce.

La segunda es la "variante b", que codifica para una proteína de 340 aminoácidos. Su mRNA se corresponde con el de las "variantes b" de las bases de datos consultadas anteriormente.

Por último, aparece una tercera "variante c" que codifica para una proteína de tan sólo 53 aminoácidos, cuya presencia no se ha podido demostrar de manera experimental. Esta variante correspondería con una de las secuencias que se describen en la base de datos Ensembl. Al fijarnos en la secuencia de cDNA de esta tercera variante, en ella aparece otro exón que no se encuentra en ninguna de las variantes anteriores. Este exón aparece justo después del exón 1 y antes del exón 3 ó 2 de las variantes "a y b," respectivamente. Por esta razón lo hemos nombrado como exón 3. La base de datos UniProt predice un nivel bajo de transcripción de esta variante al aparecer un codón de STOP prematuro en su secuencia de mRNA. Esto puede provocar la aparición de un mecanismo de "nonsense-mediated mRNA decay" (NMD), aunque no se ha demostrado de manera experimental (Maquat, 2004).

Reuniendo la información de las tres bases de datos observamos que nos encontramos ante un gen capaz de generar tres transcritos diferentes, con una organización genómica distinta a la hasta ahora conocida, con 11 exones y 10 intrones.

Ninguna de las tres variantes contiene los 11 exones en su mRNA. La "variante a" está formada por los exones 1, 2, 4-11; la "variante b" por los exones 1, 4-11; y la "variante c" por los exones 1, 3-11.

La organización de todos los exones del gen *HMGCLL1* y de la secuencia de aminoácidos que codifican, quedan reflejadas en las siguientes figuras 4.11 y 4.12.

```

cctctcggcg cgcgcgcagt ggcgagaaca gctctggtcc tcacagccag tgcaccggag
gggcgcgctc ccgagctggc gcagtttccc agcgcggtgc ccgcccctca tcctcctcca
gtctccctcc cctcgcgcac tgccgccccca ggctccgccca tggggaatgt gccatccgcg
gtgaagcaact gcctcagcta ccagcagctt ctccgggagc atctctggat cggggattca
gtggcagggg cgctcgaccc cgcgcagact tctcttctaa caaaccttca ctgctttcag
cccgatgtct ctggcttctc agtctccttg gcaggcacgg tggcttgat ccaactgggag
cttcagtctg tgatgctgat gctgcacat ggacctctca ggaagccctg atccccatca
tatttgaggg cacctctccc tcttttacta aaggaaacat cccagttatc tggactccct
gagtttggtta aatatagtaga agttgggcct agggatggat tgcagaatga aaaggttata
gttcctacag atataaaaat tgaatttctc aatcgacttt cccaaactgg cttgtctgta
atagaagtga ctagctttgt gtcttccaga tgggtaccac agatggctga tcacactgaa
gtaatgaaag gcattcatca atatccagga gttcgcctatc ctgtccttac tcctaactctt
cagggttttc accatgctgt tgctgctgga gctactgaga tatcagtttt tggagctgca

```

tctgaatcct ttagcaagaa gaatattaac tgttccattg aagaaagtat gggaaaattt
 gaggagggtg ttaagtctgc aagacacatg aatattccag cacgagggta tgtgtcttgt
 gctctgggct gtccatatga aggaagtatt acaccgcaa aagtgcaga agtgtctaag
 agattgtacg gcatgggttg ttatgagatc tctctaggag acacaattgg agtgggaact
 ccaggaagta tgaaaagaat gttggaaagt gtgatgaaag aaatcccacc aggtgctctt
 gctgttcact gtcatgacac atacggacaa gccttagcaa atatccttac ggccttcag
 atgggaatta atgtggtgga ctccgcagta tccggattag gtggctgccc ttatgcaaaa
 ggtgcttctg ggaatgtagc cactgaggat ttgatata tgcttaatgg cctggggctc
 aatacagggtg tgaatctata caaagtgatg gaagctgggtg actttatittg caaagctgtg
 aataaaacca caaactctaa agtagcacia gcctccttca atgcttgact tgaatggatt
 tatgacgtac cgttgagaag atcaatttca gctacaatac tcatctgaaa atcattaatg
 ccaacttgct ctgatatgtg aagtaatgga caagagtggg aaaaaagaga tccttttcaa
 aaagattata actggataga ttaagtcaac aaaatgcaat atcagtcac aggtaaatg
 caagctgagg ataaataata aaacttgta taattttgaa ctgggaaaaa agtttctttt
 gctctcatag aaataacttt ttaatttagt agatgggaaa attgacttctg tatttccca
 agtatcaaat actgtgttaa tacttaatac agcaggctta aactgtgta catattgtca
 gtagtttatg agctcctgca tagtatgcag agtgtgtggc ctcaatatta tacattatgc
 ctctggatct caactactca ttgccaagt cagttatggt atggaccaa agccaaatct
 ccatctgacc ctacataatt ttagcaatag aacttttata tttcaagtat ggctaacatc
 tgtaactat ttcagtgact ttatctgggt ccaagaggct gtggccaatg gcaagatgcc
 atatcctgga aacatattac gacctccat gtttggtaca tgcattccagt ttaccacact
 ttacctgtca tcagttatag taaaaccag catgggtgta ctcaactatt gagaaattgt
 aagctatttt tttttgtcct gatgtctaaa ttgcagtgat aagaataggt tgatacatgt
 atcataatct acctttataa ttttcagatc actttcaaat tgcccaagga aatattgtga
 tcctaagaat attaagataa ttttaggtta atgaaatacc cattttcctt ttattcatgg
 tgctttgctt acccacatta ttttttggtg tatttttttag tggttatttt agaagttgaa
 gtggctgaaa ttttgtctat tgtcttagaa ttgattgcca gaaattgcaa gatgtaatat
 atcaaagtca gggatgagga gcaggaggac tattcaagat aaacttctgt aacctatgca
 tattttatgg gggcagtatt attacaaatg gatctgaaat gtcagttcta gtatttagag
 agacttctct aataataccg ggtgatatta tctttgagta aatttgaata taaattgaaa
 cataaaaatg agtattgtga actttctagg aatattcat taaaaccatt gaaataaaaa
 taaattcaag aaagtaaaaa aaaaaaa

Exón 1 Exón 2 Exón 3 Exón 4 Exón 5 Exón 6 Exón 7 Exón 8 Exón 9 Exón 10 Exón 11

Figura 4.11. Organización por exones del cDNA del gen *HMGCLL1*.

```

1  MGNVPSAVKH  CLSYQQLLRE  HLWIGDSVAG  ALDPAQTSL  TNLHCFQPDV  SGFSVSLAGT
1  MGNVPSAVKH  CLSYQQLLRE  HLWIGDSVAG  ALDPAQ----  -----
1  MGNVPSAVKH  CLSYQQLLRE  HLWIGDSVAG  ALDPAQ-----  -----
*****      *****      *****      *****

61  VACIHWETSQ  LSGLPEFVKI  VEVGPRDGLQ  NEKVIVPTDI  KIEFINRLSQ  TGLSVIEVTS
37  -----ETSQ  LSGLPEFVKI  VEVGPRDGLQ  NEKVIVPTDI  KIEFINRLSQ  TGLSVIEVTS
37  -----      -----      -----ELQ  S-----
          **

121  FVSSRWVPQM  ADHTEVMKGI  HQYPGVRYPV  LTPNLQGFHH  AVAAGATEIS  VFGAASESFS
91  FVSSRWVPQM  ADHTEVMKGI  HQYPGVRYPV  LTPNLQGFHH  AVAAGATEIS  VFGAASESFS
41  -----      -----VMLML  HHGP-LRKP-  -----
          ** : * : * : *

181  KKNINCSIEE  SMGKFEEVVK  SARHMNI PAR  GYVSCALGCP  YEGSITPQKV  TEVSKRLYGM
151  KKNINCSIEE  SMGKFEEVVK  SARHMNI PAR  GYVSCALGCP  YEGSITPQKV  TEVSKRLYGM
53  -----

241  GCYEISLGD  IGVGTPGSMK  RMLESVMKEI  PPGALAVHCH  DTYGQALANI  LTALQMGINV
211  GCYEISLGD  IGVGTPGSMK  RMLESVMKEI  PPGALAVHCH  DTYGQALANI  LTALQMGINV
53  -----

301  VDSAVSGLGG  CPYAKGASGN  VATEDLIYML  NGLGLNTGVN  LYKVMEAGDF  ICKAVNKTTN
271  VDSAVSGLGG  CPYAKGASGN  VATEDLIYML  NGLGLNTGVN  LYKVMEAGDF  ICKAVNKTTN
53  -----

361  SKVAQASFNA
331  SKVAQASFNA
53  -----

```

Figura 4.12. Alineamiento de las tres potenciales isoformas de la proteína HL-Like1.

4.2.2. ANÁLISIS DE LAS BASES DE DATOS DE ESTs

La búsqueda en la base de datos NCBI-Unigene de ESTs del gen *HMGCLL1* dio como resultado el hallazgo de 77 ESTs. La localización de variantes se planteó de manera manual, comparando con el programa BLAST cada una de ellas con la secuencia del genoma completo del gen *HMGCLL1*. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

Secuencias parciales de cDNAs: ESTs.

T27074.1	Clone LLAB255D11	brain	5' read	P
R34667.1	Clone IMAGE:37037	brain	5' read	P
R38957.1	Clone IMAGE:24959	brain	3' read	A
T09237.1	Clone HIBBR10	brain	3' read	A
T09238.1	Clone HIBBR10	brain	5' read	P
F06678.1	Clone c-1gg11	brain		P
CV024410.1		mixed	5' read	P
DN992521.1	Clone TC106776	brain	5' read	P
DN992637.1	Clone TC102155	brain	5' read	P

AV727510.1	Clone HTCASA07	brain	5' read	A
DA339110.1	Clone BRHIP3040821	brain	5' read	P
DA162360.1	Clone BRAMY2022756	brain	5' read	P
DA201461.1	Clone BRAWH2006060	brain	5' read	P
DA197892.1	Clone BRAWH2000651	brain	5' read	P
DA158757.1	Clone BRAMY2018391	brain	5' read	P
DA198979.1	Clone BRAWH2002350	brain	5' read	P
DA250483.1	Clone BRCAN2000299	brain	5' read	P
DA089753.1	Clone BRACE2045260	brain	5' read	P
DA129400.1	Clone BRALZ2000270	brain	5' read	P
DA057273.1	Clone BRACE2003746	brain	5' read	P
DA169980.1	Clone BRAMY2031934	brain	5' read	P
DA248338.1	Clone BRAWH3047747	brain	5' read	P
DA343581.1	Clone BRSSN2003726	brain	5' read	P
DA155319.1	Clone BRAMY2014238	brain	5' read	P
DA149669.1	Clone BRAMY2007235	brain	5' read	P
DA496891.1	Clone FCBBF3009849	brain	5' read	P
DA502358.1	Clone FCBBF3016890	brain	5' read	P
DA352691.1	Clone BRSSN2016063	brain	5' read	P
DA497340.1	Clone FCBBF3010400	brain	5' read	P
DA497712.1	Clone FCBBF3010861	brain	5' read	P
DA506851.1	Clone FCBBF3022747	brain	5' read	P
DA508472.1	Clone FCBBF3024757	brain	5' read	P
DA366692.1	Clone BRSTN2014678	brain	5' read	P
DA490410.1	Clone FCBBF3001611	brain	5' read	P
DA484488.1	Clone FCBBF2001175	brain	5' read	P
DA523486.1	Clone FEBRA2014290	brain	5' read	P
DA525352.1	Clone FEBRA2016825	brain	5' read	P
DA525952.1	Clone FEBRA2017592	brain	5' read	P
DA493422.1	Clone FCBBF3005408	brain	5' read	P
DA527010.1	Clone FEBRA2019021	brain	5' read	P
DA528201.1	Clone FEBRA2020564	brain	5' read	P
DA489911.1	Clone FCBBF3001018	brain	5' read	P
DA768275.1	Clone OCBBF2000190	brain	5' read	P
DA783075.1	Clone OCBBF2019088	brain	5' read	P
DA746151.1	Clone NT2RP7011139	testis	5' read	P
DA826343.1	Clone PERIC2007683	heart	5' read	P
DB179645.1	Clone TKIDN2017272	kidney	5' read	P
DB303822.1	Clone BRAWH2000651	brain	3' read	
BF966299.1	Clone IMAGE:4375706	brain	5' read	P
BF966735.1	Clone IMAGE:4375706	brain	3' read	
DB545509.1	Clone H023073A14	brain	3' read	
DB567822.1	Clone H033063F11	brain	3' read	A
DB464768.1	Clone H023012N03	brain	5' read	P
DB486620.1	Clone H033013B08	brain	5' read	
DB473003.1	Clone H023057O05	brain	5' read	P
DB574184.1	Clone H033086C18	brain	3' read	A
DB541757.1	Clone H023057O05	brain	3' read	

DB476806.1	Clone H023073A14	brain	5' read	P
DB555636.1	Clone H033013B08	brain	3' read	
DB496799.1	Clone H033063F11	brain	5' read	P
DB531102.1	Clone H023012N03	brain	3' read	A
BG702932.1	Clone IMAGE:4817349	brain	5' read	P
BG703604.1	Clone IMAGE:4818781	brain	5' read	P
DC308104.1	Clone BRACE3019257	brain	5' read	P
DC326283.1	Clone BRCAN2008738	brain	5' read	P
DC374558.1	Clone OCBBF2008321	brain	5' read	P
DC350014.1	Clone FCBBF2005858	brain	5' read	P
DC374726.1	Clone OCBBF2010585	brain	5' read	P
DC313127.1	Clone BRAMY2002628	brain	5' read	P
DC315537.1	Clone BRAMY2031697	brain	5' read	P
DC313615.1	Clone BRAMY2008767	brain	5' read	P
BI824058.1	Clone IMAGE:5179914	mixed	5' read	P
BM677074.1	Clone UI-E-EO1-aib-p-07-0-UI	eye	3' read	PA
T80309.1	Clone IMAGE:24959	brain	5' read	P
CA842342.1	Clone IMAGE:	pancreas	3' read	A
CA847960.1	Clone IMAGE:	pancreas	5' read	
AA628723.1	Clone IMAGE:1034234	embryonic tissue	3' read	A

Figura 4.13. Secuencias de ESTs del gen *HMGCLL1* en NCBI-Unigene. La sigla **P** indica que la secuencia traducida tiene parecido con proteínas conocidas. **A** señala que la secuencia tiene una señal de poliadenilación.

El código de colores que aparece en la figura es el siguiente:

- ■ Rojo: secuencia que coincide con el gen *HMGCLL1* (variante a).
- ■ Negro: faltan los exones 2 y 3 del gen (variante b).
- ■ Verde: secuencia que coincide con el gen *HMGCLL1* (variante c).
- ■ Verde caqui: zona 3' del cDNA, puede ser cualquier variante.
- ■ Morado: faltan los exones 6 y 7.
- ■ Azul: falta el exón 6.
- ■ Rosa fucsia: faltan los exones 2 a 7.
- ■ Naranja: faltan los exones 6, 7 y 8.
- ■ Azul verdoso: faltan los exones 5, 6, 7 y 8.
- ■ Marrón: faltan los exones 6 a 9.
- ■ Gris: falta el exón 7.

De las 77 secuencias revisadas, algunas pertenecen a diferentes variantes del gen *HMGCLL1*, la mayoría de ellas a la "variante b", y otras poseen deleciones de algunos exones. Estas variaciones se indican en las siguientes tablas.

Tejido de procedencia	Delección exón 3 (Variante a)	Delección exones 2 y 3 (Variante b)	Delección exón 2 (Variante c)	Cualquiera de las tres variantes
Cerebro fetal	DA489911.1	DA496891.1 DA502358.1 DA528201.1 DC374558.1 DC374726.1 DA497340.1 DA497712.1 DA508472.1 DA523486.1 DA768275.1 DA783075.1 DA506851.1 DA484488.1 DA525352.1 DA527010.1 DA490410.1 DA493422.1 DC350014.1	DA525952.1	
Cerebelo		DA089753.1 DA057273.1 DC308104.1		
Soares feto total (8-9 semanas)				AA628723.1
Cerebro adulto		DN992521.1 DN992637.1 DA198979.1 DA248338.1 DA197892.1		DA201461.1 DB303822.1
Amígdala		DA162360.1 DA169980.1 DA149669.1 DA158757.1 DC315537.1 DC313127.1 DC313615.1		DA155319.1
Hipocampo		BG703604.1 DB464768.1 DA339110.1 BF966299.1 DB473003.1 DB476806.1 BG702932.1		BF966735.1 DB545509.1 DB567822.1 DB574184.1 DB541757.1 DB555636.1 DB531102.1

Substantia nigra	DA343581.1		
	DA352691.1		
Núcleo subtalámico	DA366692.1		
Núcleo caudal	DA250483.1		
	DC326283.1		
Cortez con Alzheimer	DA129400.1		
Teratocarcinoma			
línea celular NT2	DA766151.1		
Pericardio	DA826343.1		
Riñón	DB179645.1		
Mezcla de tejidos	CV024410.1		
	BI824058.1		
Núcleo caudal	DA250483.1		
	DC326283.1		
Cortez con Alzheimer	DA129400.1		
Teratocarcinoma			
línea celular NT2	DA766151.1		
Pericardio	DA826343.1		
Ojo fetal		BM677074.1	
Islotes pancreáticos		CA842342.1	
Cerebro niño		T27074.1	
		R34667.1	
		T09238.1	
		F06678.1	
		T80309.1	
		R38957.1	
		T09237.1	
	1 / 77	53 / 77	1 / 77
			22 / 77

Tabla 4.2. Secuencias de ESTs del gen *HMGCLL1* ordenadas según la variante y tejido al que pertenecen.

Tránsito	Delección exones 2 a 7	Delección exón 5, 6, 7 y 8	Delección exón 6	Delección exón 6 y 7	Delección exón 6, 7 y 8	Delección exón 6, 7, 8 y 9	Delección exón 7
Hipocampo		BG702932.1	DA339110.1 BF966299.1 DB473003.1 DB476806.1				
Amígdala	DA155319.1		DC313127.1 DC315537.1 DB496799.1 DC308104.1 DC326283.1	DA158757.1	DC313615.1		
Hipotálamo				DA250483.1			
Cerebelo				T27074.1			
Núcleo caudal				R34667.1			
Cerebro niño					DA490410.1	DC350014.1	
Cerebro fetal							DA201461.1
Cerebro							
TOTAL	1 (cualquier variante)	1 (variante b)	9 (variante b)	4 (2 variante 2; 2 cualquier variante)	2 (variante b)	1 (variante b)	1 (cualquier variante)

Tabla 4.3. Secuencias de ESTs que poseen deleciones de alguno de los exones del gen *HMGCLL1*. Se indica también la variante a la que pertenecen estas deleciones.

4.2.3. AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS SOLAPANTES DEL cDNA DEL GEN *HMGCLL1*

Se realizaron las amplificaciones planteadas en la tabla 3.31 de Material y Métodos, a partir de paneles comerciales con cDNA procedente de los tejidos cerebro, pulmón, riñón, músculo esquelético, bazo, corazón e hígado fetales y cerebro, pulmón, riñón, músculo esquelético, bazo, corazón, hígado, páncreas, testículo, placenta, intestino y ovario adultos. Los resultados se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2%.

En las siguientes figuras se exponen los resultados de las electroforesis. Algunas amplificaciones produjeron un único fragmento que se correspondía con el tamaño esperado de la variante b con delección de los exones 2 y 3, pero en otras se encontraron bandas con tamaños diferentes.

En primer lugar, se realizó una PCR que amplificaba al gen completo desde el ATG hasta el codón de STOP. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente figura 4.14.

Además de la banda de aproximadamente 1000 pb correspondiente al cDNA del gen *HMGCLL1* desde el codón de inicio al de STOP, aparecen otras bandas de diferente tamaño (tanto en tejidos fetales como adultos), que se corresponden con las variantes de *splicing* del gen.

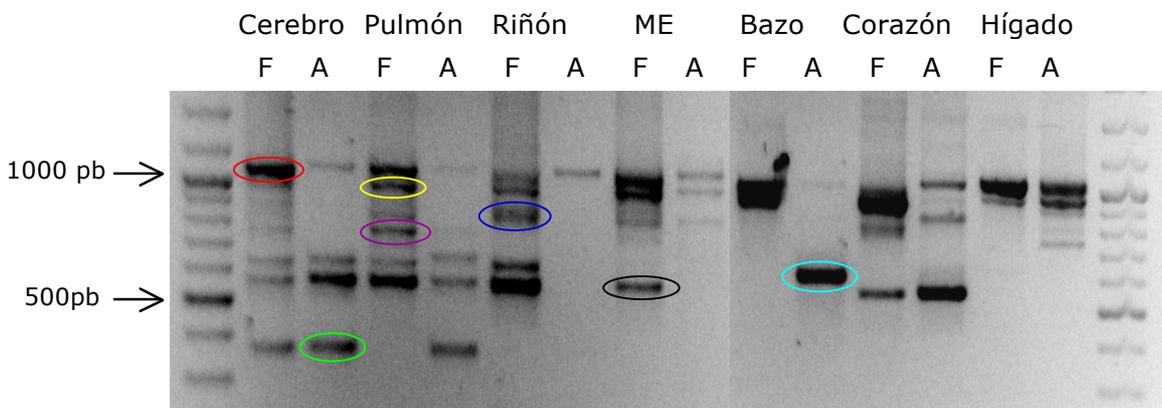


Figura 4.14. Amplificación usando los primers LK-ATG y LK-STOP. Aparecen bandas de distintos tamaños. La banda rodeada en rojo corresponde con la "variante b" completa (1046 pb). Amarillo: delección del exón 6 (960 pb). Azul: delección de los exones 6 y 7 (802 pb). Morado: delección de los exones 6 a 8 (729 pb). Azul turquesa: delección de los exones 2 a 7 (612 pb). Negro: delección de los exones 6 a 9 (549 pb). Verde: delección de los exones 2 a 9 (359 pb).

Para conocer qué exones se eliminaban en estas variantes se eligieron los tejidos cerebro y pulmón, tanto fetal como adulto, para profundizar en su estudio. Se realizaron diferentes amplificaciones que exploraban los distintos exones. Los resultados se muestran en las figuras siguientes.

Cuando se realizan las amplificaciones con las parejas de primers LKF1/LKR4 (explora los exones 1 a 4) (Figura 4.15) y LKF1/LKR6 (explora los exones 1 a 6) (Figura 4.16), sólo se encuentra una banda del tamaño esperado para la "variante b" del gen *HMGCLL1* (86 pb y 314 pb respectivamente). No aparece ninguna banda correspondiente a las variantes "a o c" del gen.

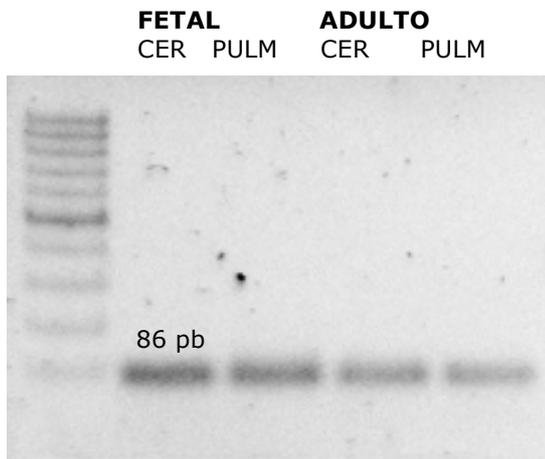


Figura 4.15. Amplificación con los primers LKF1 y LKR4. Aparece una única banda del tamaño esperado para la variante b.

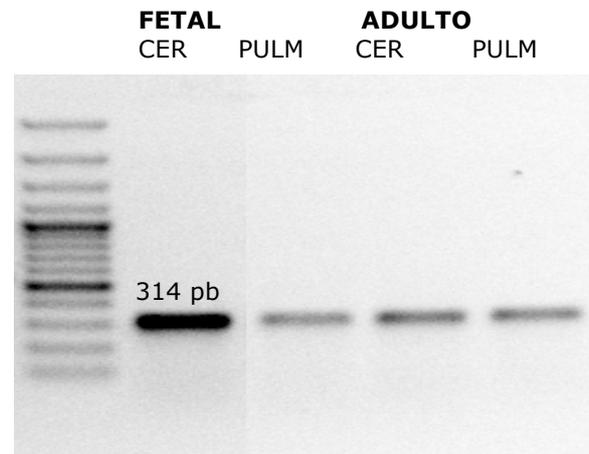


Figura 4.16. Amplificación con los primers LKF1 y LKR6. Aparece una única banda del tamaño esperado para la variante b.

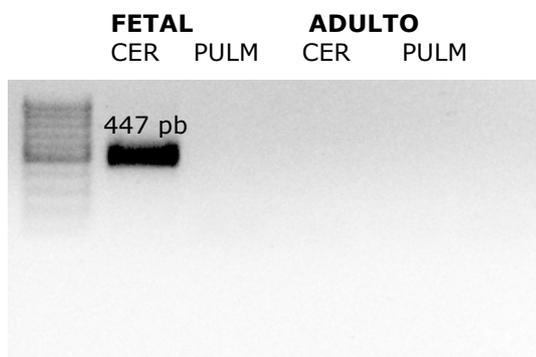


Figura 4.17 Amplificación con los primers LKF2 y LKR7. Aparece una única banda del tamaño esperado para la variante a (447 pb).

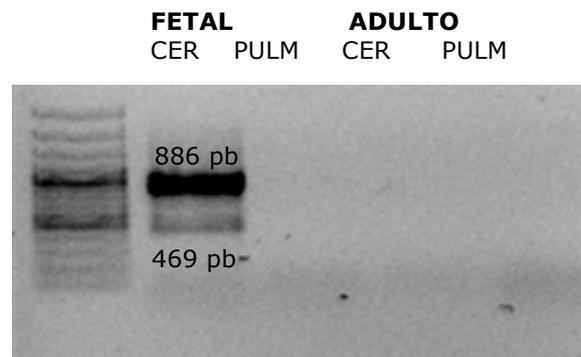


Figura 4.18 Amplificación con los primers LKF2 y LKR10. Aparece una banda del tamaño esperado para la variante a (886 pb) y otra de menor tamaño (469 pb) correspondiente a la delección de los exones 3 a 7.

Cuando se emplea como primer forward uno que hibridaba sobre el exón 2 (específico de la "variante a" del gen *HMGCLL1*), sólo aparece una banda del tamaño esperado en cerebro fetal (447 pb figura 4.15; 886 pb figura 4.18). Además también encontramos otra banda de menor tamaño correspondiente a la delección de los exones 3 a 7 de la "variante a".

Cuando se emplea un primer que hibrida de manera específica en el exón 3 (sólo presente en la "variante c"), se obtienen bandas del tamaño esperado sólo en los tejidos fetales. Los tejidos adultos carecen de esta variante del gen.

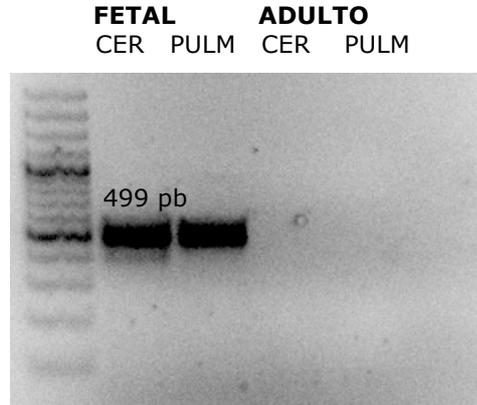


Figura 4.19. Amplificación con los primers LKF3 y LKR7. Aparece una única banda del tamaño esperado para la variante c (499 pb).

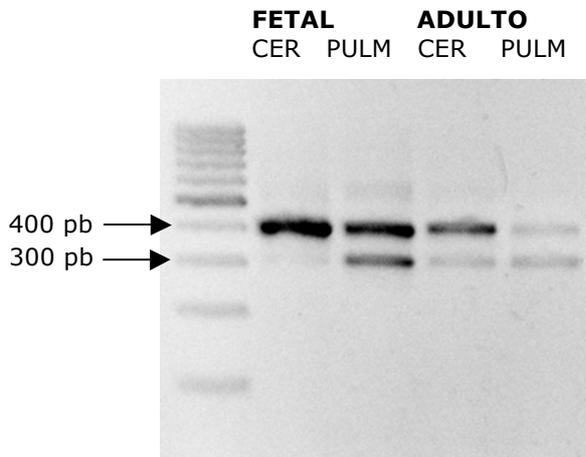


Figura 4.20. Amplificación con los primers LKF4 y LKR7. Aparece una banda del tamaño esperado para la variante b (405 pb) y otra de menor tamaño que se corresponde con la delección del exón 6 (319 pb).

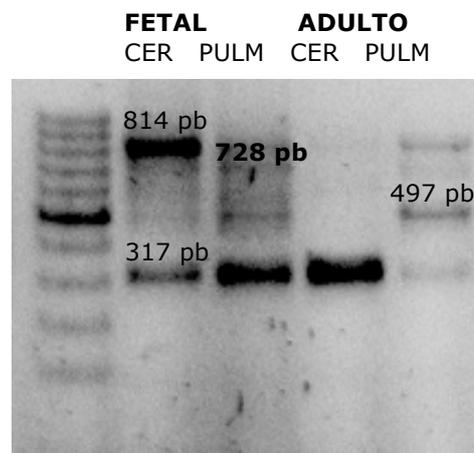


Figura 4.21. Amplificación con los primers LKF4 y LKR10. Aparece una única banda del tamaño esperado para la variante b (814 pb) y otras de menor tamaño correspondiente a las delecciones de los exones 6 (728 pb), 6 a 8 (497 pb) y 6 a 9 (317 pb).

Los resultados obtenidos con la pareja de primers LKF4/LKR7, que explora los exones 4 a 7, nos muestran dos bandas, una del tamaño

esperado (405 pb) y otra correspondiente a un transcrito alternativo con la delección del exón 6 (319 pb) (Figura 4.20).

Los resultados de la PCR con la pareja de primers LKF4/LKR10, que exploran los exones desde el 4 al 10, nos muestran bandas de diferente tamaño. La mayor de ellas (814 pb) corresponde al tamaño esperado, la de 728 pb procede de la variante con la delección del exón 6, la banda de 497 pb corresponde con la delección de los exones 6 a 8 y la de la 317 pb con la delección de los exones 6 a 9 del gen *HMGCLL1* (Figura 4.21).

En las amplificaciones con la pareja de primers LKF5/LKR9, que estudia los exones del 5 al 9, aparecen las variantes de *splicing* correspondientes a las deleciones de los exones 6 (441 pb), 6 y 7 (283 pb) y 6 a 8 (210 pb). La banda de 527 pb corresponde al tamaño esperado (Figura 4.22).

En las PCRs con los primers LKF5/LKR10, que exploran los exones del 5 al 10, además de la banda de 692 pb correspondiente al tamaño esperado, aparecen otras bandas de menor tamaño pertenecientes a los transcritos alternativos con delección de los exones 6 (606 pb), 6 a 8 (375 pb) y 6 a 9 (195 pb) (Figura 4.23).

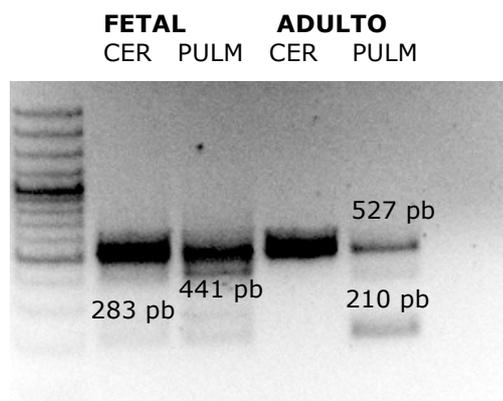


Figura 4.22. Amplificación con los primers LKF5 y LKR9. Aparece una banda del tamaño esperado para la variante b (527 pb) y otras de menor tamaño que se corresponden con las deleciones de los exones 6 (441 pb), 6 y 7 (283 pb) y 6 a 8 (210 pb).

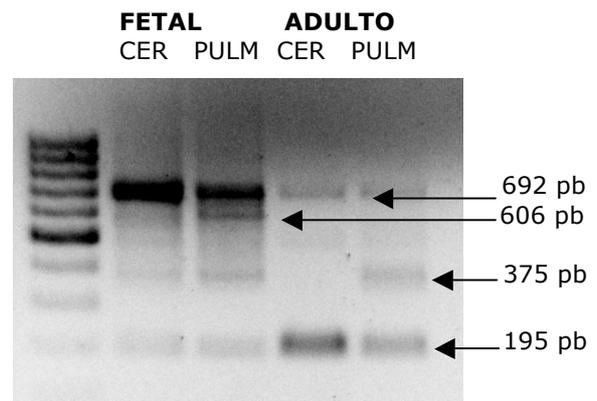


Figura 4.23. Amplificación con los primers LKF5 y LKR10. Aparece una banda del tamaño esperado para la variante b (692 pb) y otras de menor tamaño correspondiente a las deleciones de los exones 6 (606 pb), 6 a 8 (375 pb) y 6 a 9 (195 pb).

Tanto en las amplificaciones con los primers LKF6/LKR10, que exploran los exones del 6 al 10, como con los primers LKF7/LKR10, que exploran los exones del 7 al 10, sólo se observa una banda del tamaño esperado (Figuras 4.24 y 4.25).

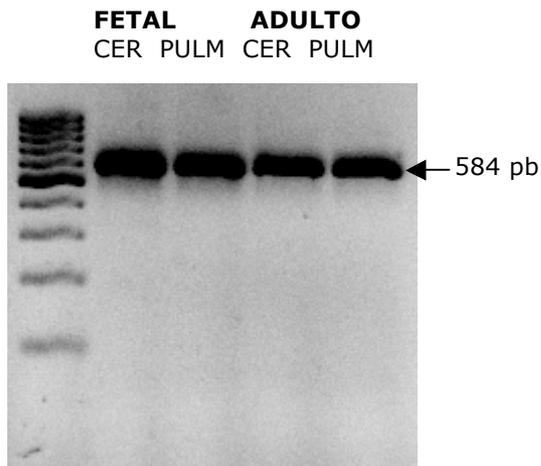


Figura 4.24. Amplificación con los primers LKF6 y LKR10. Aparece una única banda del tamaño esperado para la variante b (584 pb).

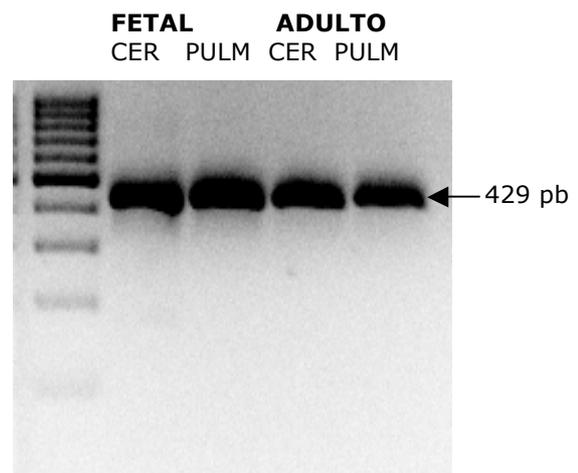


Figura 4.25. Amplificación con los primers LKF7 y LKR10. Aparece una única banda del tamaño esperado para la variante b (429 pb).

4.2.4. SECUENCIACIÓN MEDIANTE CLONAJE EN EL PLÁSMIDO PCR2.1-TOPO DE LAS VARIANTES DE *SPLICING*

Para comprobar si las bandas de menor tamaño, encontradas por medio de la metodología de los fragmentos solapantes, correspondían a variantes de *splicing* del gen *HMGCLL1* y facilitar su secuenciación se clonaron en el plásmido pCR2.1-TOPO algunas de las amplificaciones obtenidas.

Tras chequear las colonias por medio de la PCR boiling, se obtuvo el DNA plasmídico y se envió a secuenciar para conocer qué variante de *splicing* se había clonado en esa colonia.

Este método se empleó, junto con el de purificación de bandas de PCR del gel.

Se confirmó la presencia de las variantes de *splicing* con delección de los exones 2 a 7, 2 a 9, 6, 6 y 7, y 6 a 9. Todas estas variantes pertenecían a la "variante b" del gen al carecer también de los exones 2 y 3. Además también se encontró una variante de *splicing*, correspondiente a la "variante a" del gen, en la que se perdían los exones del 3 al 7.

Todas las delecciones encontradas en los diferentes tejidos también se hallaron en las bases de datos de secuencias de ESTs. Las secuencias de las variantes de *splicing* obtenidas se muestran a continuación.

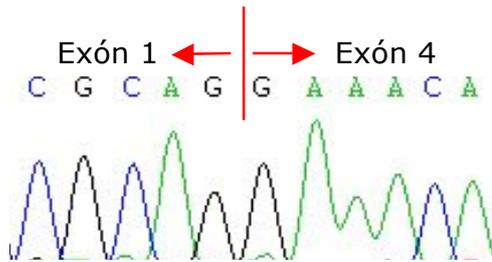


Figura 4.26. Cromatograma donde se muestra la delección de los exones 2 y 3 de la variante b del gen *HMGCLL1*.

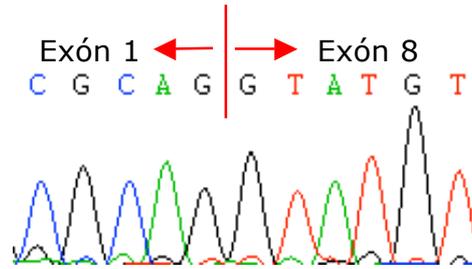


Figura 4.27. Cromatograma donde se muestra la delección de los exones 2 a 7 de la variante b del gen *HMGCLL1*.

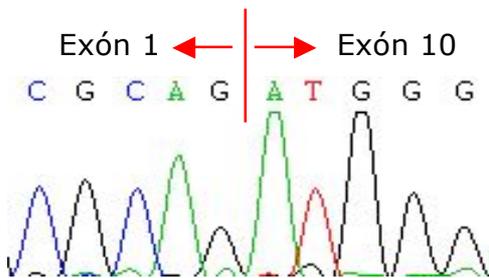


Figura 4.28. Cromatograma donde se muestra la delección de los exones 2 a 9 de la variante b del gen *HMGCLL1*.

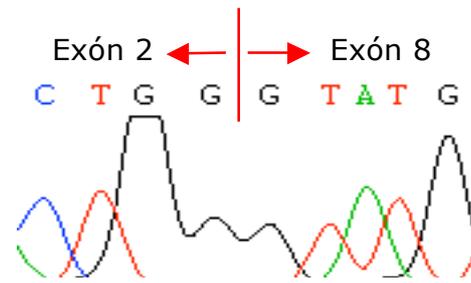


Figura 4.29. Cromatograma donde se muestra la delección de los exones 3 y 7 de la variante a del gen *HMGCLL1*.

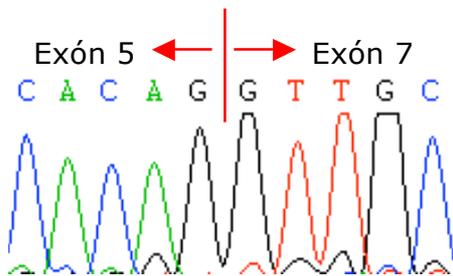


Figura 4.30 Cromatograma donde se muestra la delección del exón 6 de la variante b del gen *HMGCLL1*.

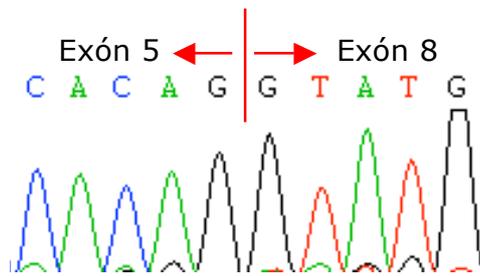


Figura 4.31 Cromatograma donde se muestra la delección de los exones 6 y 7 de la variante b del gen *HMGCLL1*.

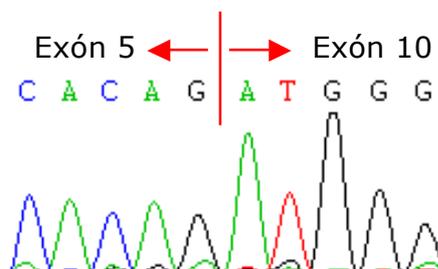


Figura 4.32. Cromatograma donde se muestra la delección de los exones 6 a 9 de la variante b del gen *HMGCLL1*.

Tomando como referencia a la denominada “variante b”, podemos clasificar a todos los transcritos encontrados en dos grandes grupos: con inserción y con delección de exones. Esta clasificación queda reflejada en las siguientes tablas.

Exón insertado	
Variante a	2
Variante c	3

Tabla 4.4. Exones que se insertan en las diferentes variantes tomando a la variante b como referencia.

Exón/exones deletados	
1	2 a 7
2	2 a 9
3	3 a 7
4	6
5	6 y 7
6	6 a 9

Tabla 4.5. Exones que se deletan en los diferentes transcritos tomando a la variante b como referencia

4.2.5. GRADO DE FORTALEZA DE LAS SECUENCIAS DONADORAS Y ACEPTORAS DE *SPLICING*

El cálculo del grado de fortaleza de las secuencias donadoras y aceptoras de *splicing* del gen *HMGCLL1* se realizó mediante el programa “Splice Site Prediction by Neural Network”. En las siguientes tablas se muestran cuáles son esas secuencias aceptoras y donadoras de intrón y su grado de fortaleza en función de los exones.

Exón	Secuencia aceptora	Secuencia donadora
1		cgcgagGTaccacc
2	tttgaactttatcttctAGacttcttctaacaacct	ccactggGTaaatat
3	cctcattcctctctcaaAGgagcttcagtctgtgatgct	actaaagGTgagaat
4	ttcttacatttgcatttcAGgaaacatcccagttatctgg	tgaaaagGTagt
5	aaatatttttgtttcatAGgttatagttcctacagatat	accacagGTatgtaa
6	tataactattatgtatttaAGatggctgatcacactgaagt	ccatgctGtaagtgt
7	tttaaattatatattttcAGgttgctgctggagctactga	cacgaggGTacttat
8	aaggctgtatttttaattAGgtatgtgtcttgctctgg	gacagaaGTAagcta
9	gcacttcacctttcaacAGgtgtctaagagattgtacgg	ccttcagGTattttg
10	gtggttgggttgtttccAGatgggaattaatgtggtgga	caatacaGTAagtta
11	attccttcatttcgtcaccAGggttgaatctatacaaagt	

Tabla 4.6. Secuencias aceptoras y donadoras de intrón del gen *HMGCLL1* en función de los exones.

El grado de fortaleza de una secuencia aceptora o donadora de intrón está entre 0 y 1. Por debajo de 0.4 se considera que el grado de fortaleza es bajo y por encima de 0.9 alto.

Exón	Grado de fortaleza secuencia aceptora	Grado de fortaleza secuencia donadora
1		0.93
2	0.76	0.99
3	0.95	1
4	0.95	0.85
5	1	1
6	0.15	0.96
7	0.96	0.73
8	0.48	0.86
9	0.69	0.44
10	0.95	0.97
11	0.59	

Tabla 4.7. Grado de fortaleza de las secuencias aceptoras y donadoras de intrón en el gen *HMGCLL1* en función de los exones.

Los grados de fortaleza de las secuencias aceptoras y donadoras indican que los exones 2 y 3 (exclusivos de las variantes a y c, respectivamente) son fuertes. Este hallazgo está en contradicción con la cantidad de ESTs que se encuentran con delección de ambos exones, y con el hecho de que sólo se ha sido capaz de amplificar estas variantes con primers que hibridaban de manera específica en esos exones.

El exón 3 posee un codón de STOP en su secuencia lo que podría explicar su ausencia en la mayoría de transcritos por un mecanismo de "nonsense-mediated mRNA decay" (Maquat, 2004).

4.3. Localización subcelular de la proteína HL-Like1 en cultivos celulares.

Para realizar el estudio de localización subcelular de la proteína HL-Like1, se clonó el cDNA de la "variante b" en el vector de expresión eucariota pEGFP-N3, ya que los resultados previos de variantes de *splicing* mostraban que ésta era la variante mayoritaria del gen *HMGCLL1*.

Simultáneamente, se clonó el cDNA de la proteína HL en el vector de expresión eucariota pDsRed2-N1. Estos vectores incorporan una proteína fluorescente, verde o roja, en su secuencia y permiten la localización

subcelular de la proteína estudiada con el uso del microscopio de fluorescencia.

4.3.1. CLONACIÓN DE LAS PROTEÍNAS HL-LIKE1 Y HL

Para la generación del vector recombinante se amplificó por PCR el cDNA de la HL-Like1 tomando como molde cDNA comercial de páncreas ("Human Multiple Tissue cDNA MTC Panels" BD Bioscience). Los primers utilizados incluyen los sitios de restricción HindIII y BamHI en las posiciones 5' y 3' respectivamente.

Se obtuvo una banda de unos 1000 pb (Figura 4.33), que se corresponde con el tamaño de la parte codificante de la enzima HL-Like1.

Las bandas de menos tamaño que aparecen pertenecen a variantes de *splicing* del gen *HMGCLL1*.

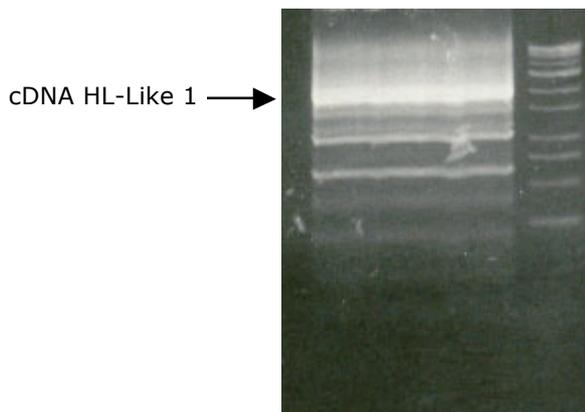


Figura 4.33. Amplificación del cDNA de la HL-Like1 con su péptido líder.

Después se realizó la ligación en el plásmido pCR2.1-TOPO y la posterior transformación en las células competentes *E. coli* XL1blue. Finalmente, se comprobó si las colonias blancas que habían crecido eran positivas por medio de una "PCR boiling" utilizando los primers LKHindIIIF y LKBamHIR.

En la figura 4.34 se muestran los resultados de estas reacciones. Las colonias que resultaron positivas se pusieron en un cultivo en medio líquido para poder aislar el DNA plasmídico.

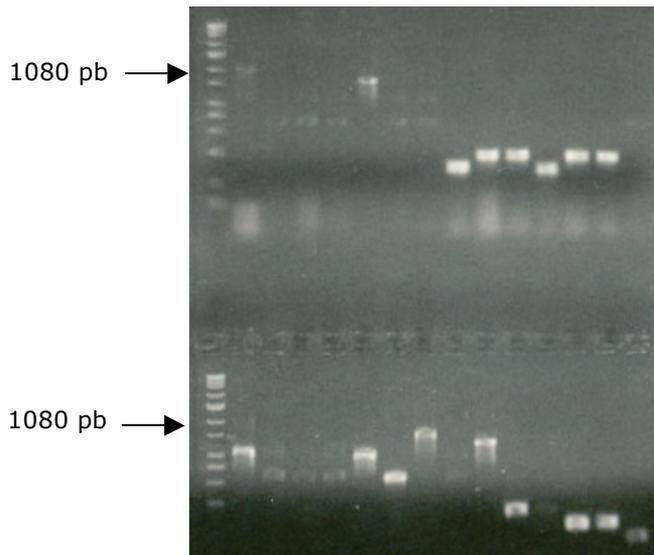


Figura 4.34. Electroforesis donde se observa el resultado de la PCR boiling. Las colonias positivas muestran una banda a 1080 pb correspondiente al cDNA del gen *HMGCLL1*.

Tras obtener el DNA del plásmido recombinante HL-Like1-pCR2.1TOPO se realizó la digestión del mismo con las enzimas de restricción HindIII y BamHI. Posteriormente se corrió la muestra digerida en un gel con bromuro de etidio (Figura 4.35).

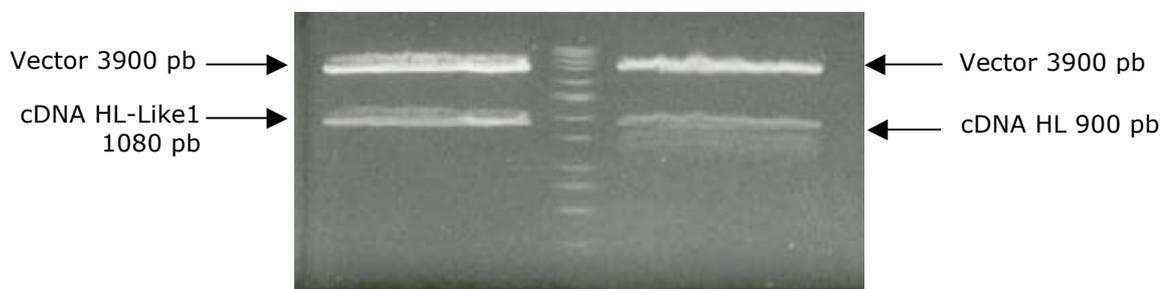


Figura 4.35. Digestión de los vectores HL-Like1-pCR2.1TOPO y HL-pCR2.1-TOPO.

Una vez aislado el inserto HL-Like1 del gel de agarosa, se ligó en el vector final pEGFP-N3 y se transformó en las células competentes *E. coli* XL1blue. Se chequearon varias colonias por "PCR boiling" obteniendo varias de ellas positivas, como se observa en la figura 4.36.

Posteriormente, mediante secuenciación, se comprobó que la secuencia de las colonias era correcta, por lo que se generó el vector HL-Like1-pEGFP-N3 de manera satisfactoria.

Para el clonaje de la proteína HL en el vector pDsRed2-N1 se realizaron los mismos pasos, obteniéndose también resultados positivos que fueron comprobados de la misma manera.

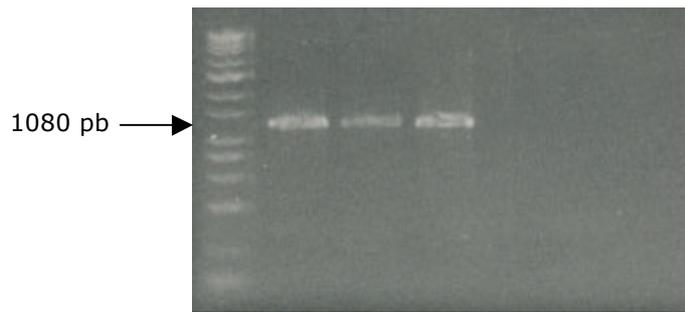


Figura 4.36. Electroforesis donde se observa el resultado de la PCR boiling realizada sobre las colonias que crecieron en medio LB-kanamicina.

4.3.2. TRANSFECCIÓN EN CÉLULAS EUCARIOTAS DE LOS VECTORES RECOMBINANTES

Una vez obtenidos los plásmidos recombinantes, estos se transfectaron en las células eucariotas HEK293. Se eligieron diferentes combinaciones de plásmidos a transfectar, tanto los obtenidos en el desarrollo de la tesis como los comerciales, con el objetivo final de conocer la localización subcelular de la proteína HL-Like1.

Una vez fijadas las células a los cover-slips, se visualizó el patrón de fluorescencia de las proteínas recombinantes transfectadas por medio de un microscopio confocal. Las imágenes obtenidas permitieron sugerir una posible localización subcelular de la proteína HL-Like1.

Por otro lado, para marcar de manera específica el peroxisoma de las células se empleó la técnica de la inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo primario que reconocía a una proteína específica de peroxisoma. Estas imágenes se muestran en la figura 4.39.

En la figura 4.37.A se muestra la expresión de la HL-Like1 (verde) y en la figura 4.37.B la del plásmido comercial pDsRed2-ER (rojo) (Clontech) el cual indica de manera específica la localización del retículo endoplasmático dentro de esas células. La figura 4.37.C muestra la colocalización de la proteína de referencia con la proteína HL-Like1. A este nivel de tamaño parece que hay una colocalización entre ambos plásmidos (amarillo) la cual se confirma en la imagen 4.37.C' donde se ve la imagen anterior ampliada.

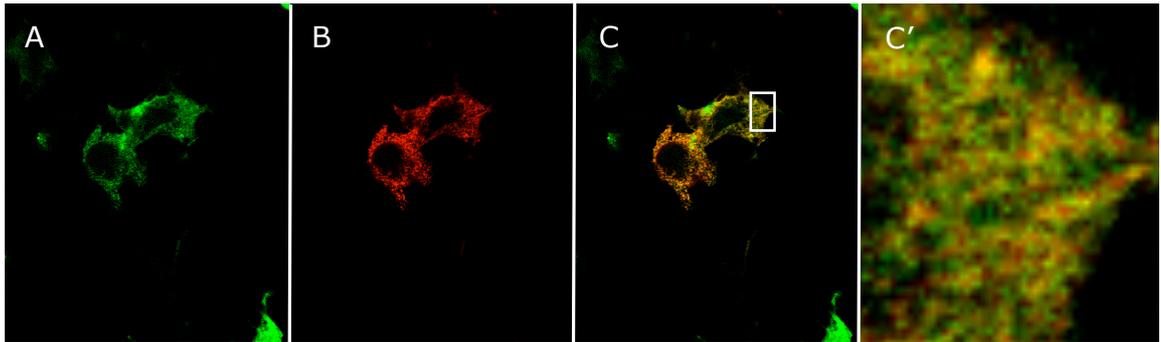


Figura 4.37 A-C células HEK293 cotransfectadas con los plásmidos recombinantes HL-Like1-pEGFP-N3 y pDsRed2-ER.

En las figuras 4.38.A-C se muestran las imágenes que permiten comparar la localización de la HL-Like1 y la HL. En la figura 4.38.A se ve la localización celular de la proteína HL-Like1 (verde) y en la figura 4.38.B la de la proteína HL, que sirve de marcador mitocondrial de las células HEK293 (rojo). La superposición de ambas imágenes se indica en la figura 4.38.C y demuestra que no parece que exista una colocalización entre ambas proteínas. Esto se confirma al observar la imagen ampliada 4.38.C' donde se ve que no hay una colocalización de la HL-Like1 con la HL mitocondrial.

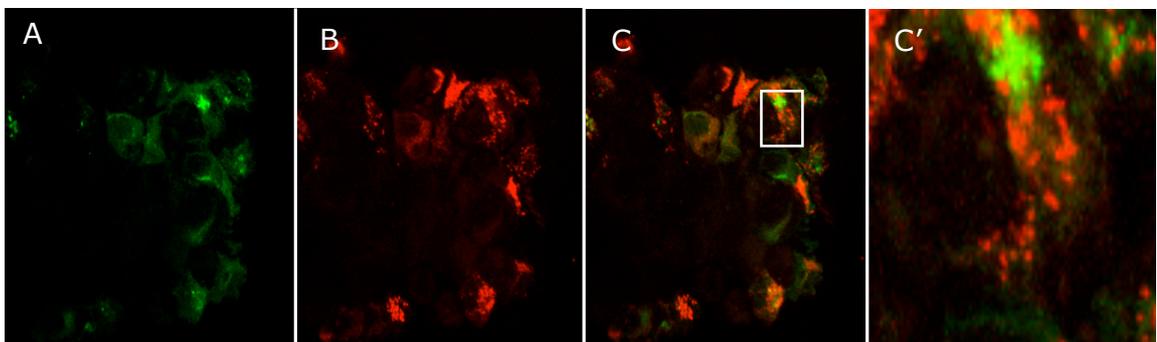


Figura 4.38. A-C células HEK293 cotransfectadas con los plásmidos recombinantes HL-Like1-pEGFP-N3 y HL-pDsRed2-N1.

La figura 4.39.A muestra lo mismo que las figuras 4.37.A y 4.38.A. En la figura 4.39.B se puede observar el marcaje por medio del anticuerpo específico anti-PMP70 del peroxisoma de las células. Al igual que ocurre con el marcaje de las mitocondrias no aparece una colocalización entre la proteína HL-Like1 y el marcador peroxisomal (Figura. 4.39.C), lo cual se puede ver de una manera más clara en la ampliación de la imagen 4.39.C'.

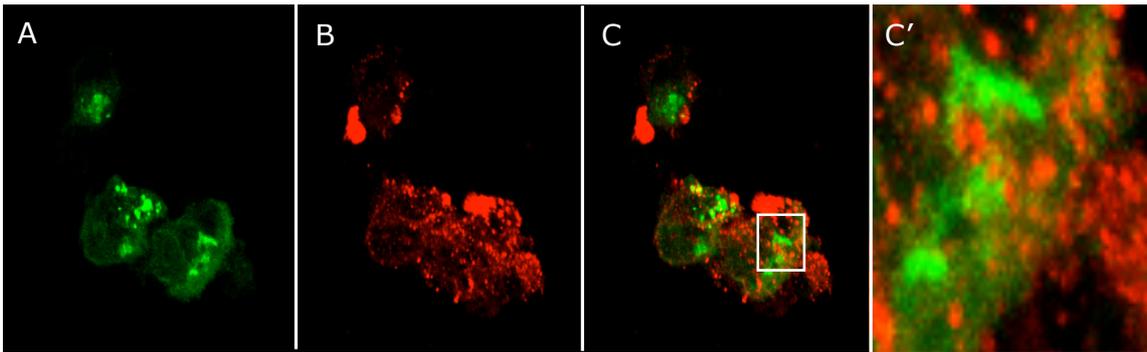


Figura 4.39. A-C Células HEK293 transfectadas con el plásmido recombinante HL-Like1-pEGFP-N3 inmunomarcadas con un anticuerpo que reconoce peroxisoma de manera específica.

4.4. Interacción de la proteína HL-Like1 con la membrana del retículo endoplasmático

Por medio de esta técnica pretendemos conocer si la proteína HL-Like1 es una proteína de membrana y, de ser así, si es una proteína integral o periférica de las membranas de retículo endoplasmático.

4.4.1. ASOCIACIÓN DE LA PROTEÍNA HL-LIKE1 A LA MEMBRANA DEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

Lo primero que se comprobó fue el comportamiento de la proteína HL-Like1 para conocer si se trataba de una proteína soluble o no. Para ello se utilizó el reactivo tritón X-114 que posee la particularidad, después de un tratamiento a 4 °C seguido de otro a 37 °C, de separarse en dos fases: una soluble y otra insoluble o membranosa.

Este tratamiento se aplicó a tres muestras, una que tenía la HL-Like1 clonada y libre, otra de retículo endoplásmico que según los hallazgos de este trabajo debía contener la HL-Like1 endógena y una última que resultaba de la suma de las dos anteriores. Tras el tratamiento y separación en fracción soluble e insoluble, se realizó un western-blot empleando como anticuerpo primario el que reconoce a la HL-Like1 de manera específica.

Los estudios indican que cuando se realiza una separación en dos fases de la proteína clonada, ésta se comporta como una proteína soluble (Figura 4.40). Por otra parte, cuando se realiza el mismo experimento tomando como muestra una fracción de retículo endoplásmico (orgánulo donde hemos demostrado su localización ver sección 4.3) la proteína HL-Like1 endógena aparece en la fracción insoluble o membranosa de la separación (Figura 4.40).

Para comprobar si se trata de una asociación real a la membrana de retículo se incubó una muestra de proteína HL-Like1 clonada con otra de membranas de retículo con HL-Like1 endógena. Los resultados muestran que la proteína clonada se une al retículo apareciendo en la fracción insoluble o membranosa (Figura 4.40.). La mancha es mucho más grande que en los experimentos anteriores porque a la HL-Like1 endógena se une la clonada. Estos resultados sugieren que la proteína HL-Like1 puede unirse por sí sola a la membrana del retículo *in vitro*.

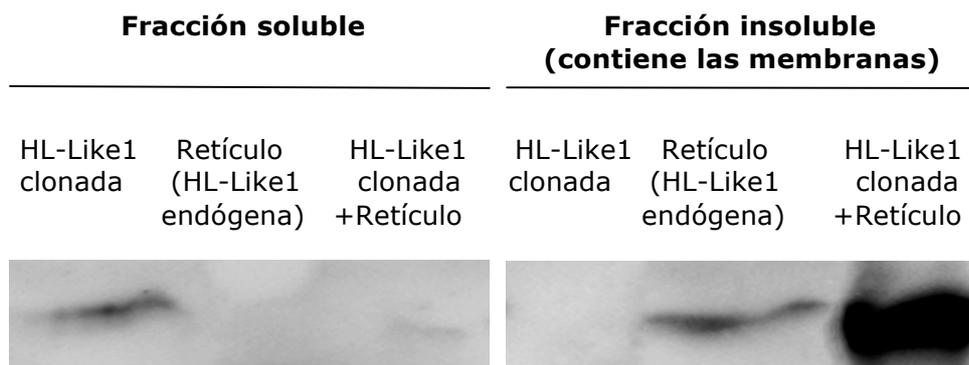


Figura 4.40. Se muestran las fracciones soluble e insoluble (membranosa) tras el tratamiento con tritón X-114 de las fracciones de la HL-Like1 clonada libre, endógena unida al retículo y juntas.

4.4.2. DISOCIACIÓN DE LA PROTEÍNA HL-LIKE1 DE LA MEMBRANA DEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

Estos experimentos permitieron comprobar si estábamos ante una proteína integral o periférica de membrana. Se basan en el uso de la urea o el NaHCO_3 , que actúan separando las proteínas periféricas de membrana al crear un medio de alta fuerza iónica. Sin embargo, no son capaces de separar las proteínas integrales al no dar lugar a la solubilización de las mismas.

Los resultados obtenidos muestran que tras un tratamiento de las membranas de retículo con urea 6 M o NaHCO_3 100 mM a pH 11.5 se produce la disociación de la proteína HL-Like1 de estas membranas. Como se observa en la figura 4.41, la proteína HL-Like1 pasa de estar en la fracción insoluble unida al retículo endoplásmico a aparecer libre en la fracción soluble después del tratamiento de las membranas.

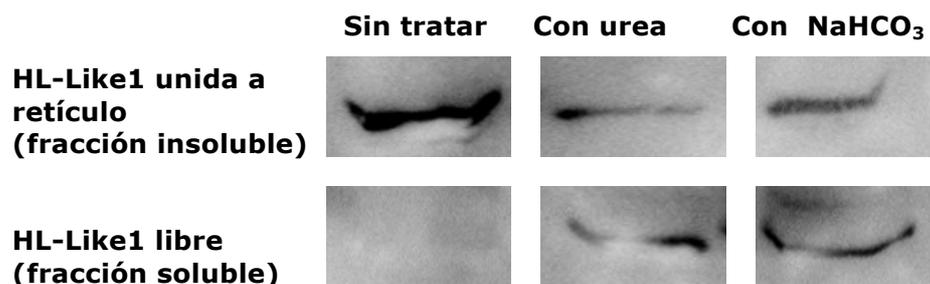


Figura 4.41. Western-blot donde se muestran el comportamiento de la HL-Like1 endógena tras un tratamiento con urea o NaHCO₃. La proteína HL-Like1 se disocia de las membranas del retículo endoplásmico pasando a estar libre.

4.5. Estudio comparativo de las enzimas HL-Like1 y HL

Para la realización de estos experimentos, se partió del vector recombinante HL-Like1-pMAL-c2x, obtenido por Sebastián Menao Guillén en su tesis doctoral (2006), y se siguió el mismo protocolo descrito por él para la obtención de la proteína recombinante.

También se llevaron a cabo distintos clonajes y la sobreexpresión de las proteínas HL-Like1 y HL en cultivos celulares eucariotas.

4.5.1. ENSAYO DE ACTIVIDAD DE LAS PROTEÍNAS HL-LIKE1 Y HL CLONADAS

A partir del extracto proteico de las proteínas clonadas se realizaron los ensayos de actividad de la HL-Like1 y HL por medio del método espectrofotométrico descrito por Wanders en 1988.

4.5.1.1. Actividad liasa de las proteínas HL-Like1 y HL clonadas y comparación con la de diferentes fracciones subcelulares

En la figura 4.42 se muestra la actividad enzimática de la HL-Like1 frente a concentraciones variables de sustrato (entre 0-300 μ M). Se observa que la reacción obedece a la ecuación de Michaelis-Menten, tanto a pH 8 como a pH 9. Estos mismos datos se representan según la gráfica de dobles recíprocos o de Lineweaver-Burk (Figura 4.42.B), para obtener los parámetros cinéticos de Vmax y Km de la HL-Like 1 con mayor exactitud.

De igual forma, se realizan las medidas de actividad de la HL (Figura 4.43). Todos estos datos cinéticos aparecen reflejados en la Tabla 4.8.

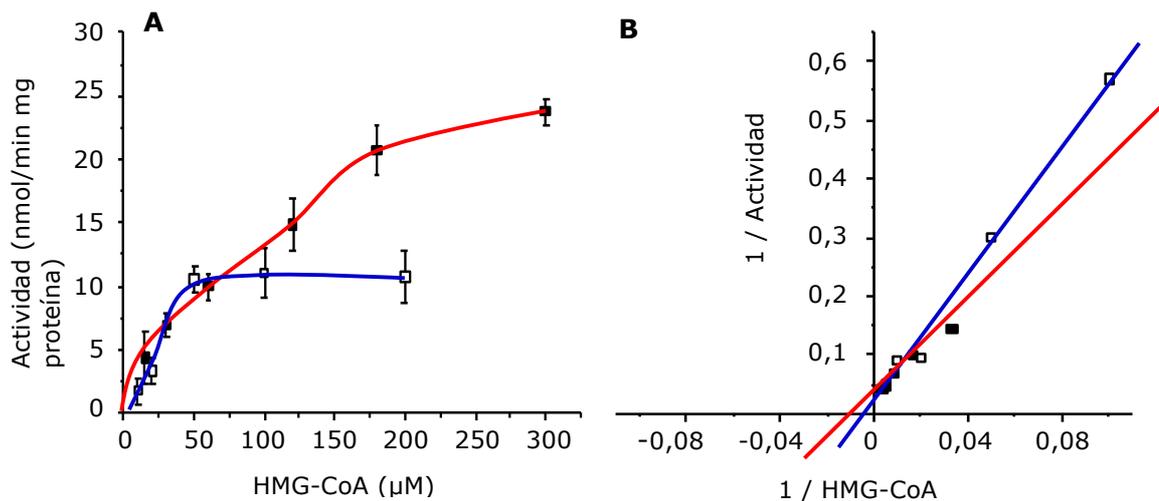


Figura 4.42. A. Curva de actividad de la HL-like 1 a pH 8 (línea roja) y pH 9 (línea azul). B. Representación de dobles inversos de los datos de la curva de la fig 4.42.A.

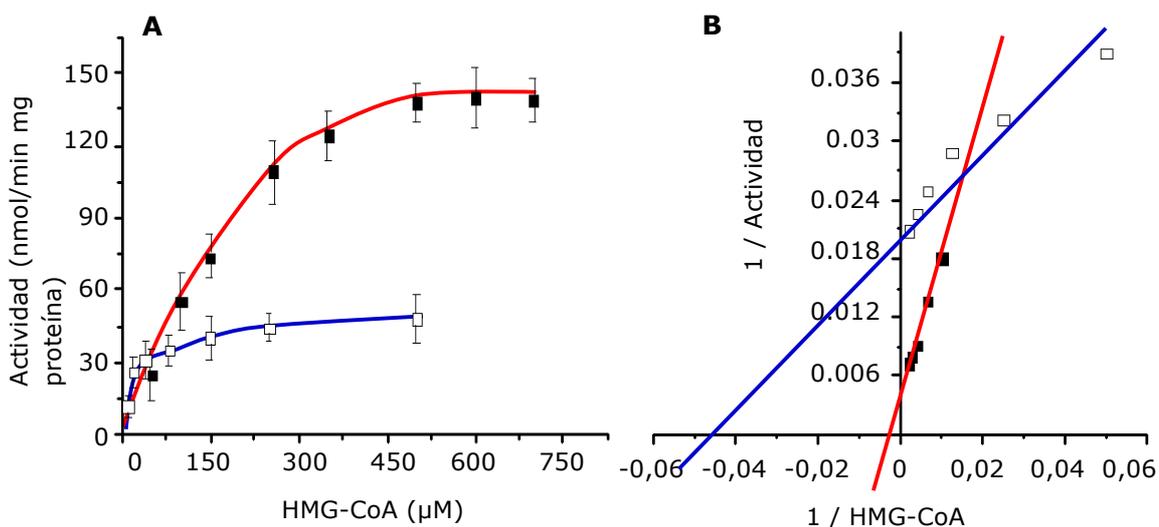


Figura 4.43. A. Curva de actividad de la HL a pH 8 (línea roja) y pH 9 (línea azul). B. Representación de dobles inversos de los datos de la curva de la fig 4.43.A.

La V_{max} de la HL-Like1 es entre 2 y 7 veces menor que la de la HL, encontrándose las mayores diferencias a pH 8.

El valor de K_m no varía entre pHs para la HL-Like1, mientras que para la HL sí. A pH 8 el valor de K_m de la HL-Like1 es dos veces menor que el de la HL, sin embargo a pH 9 es cuatro veces mayor.

También se realizaron medidas de actividad liasa en la fracción subcelular mitocondrial y de citosol + retículo endoplasmático de testículo humano. La representación de los datos obtenidos con ambas fracciones

queda reflejado en las figuras 4.44 y 4.45. Los datos cinéticos obtenidos se indican en la tabla 4.8.

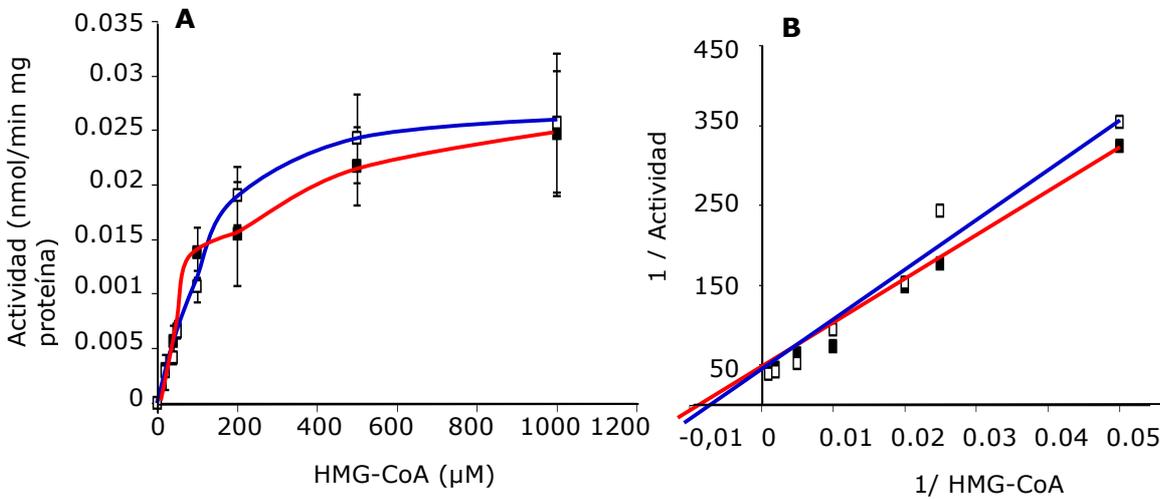


Figura 4.44. A. Curva de actividad de la fracción citosólica del testículo humano a pH 8 (línea roja) y pH 9 (línea azul). B. Representación de dobles inversos de los datos de la curva de la fig 4.44.A.

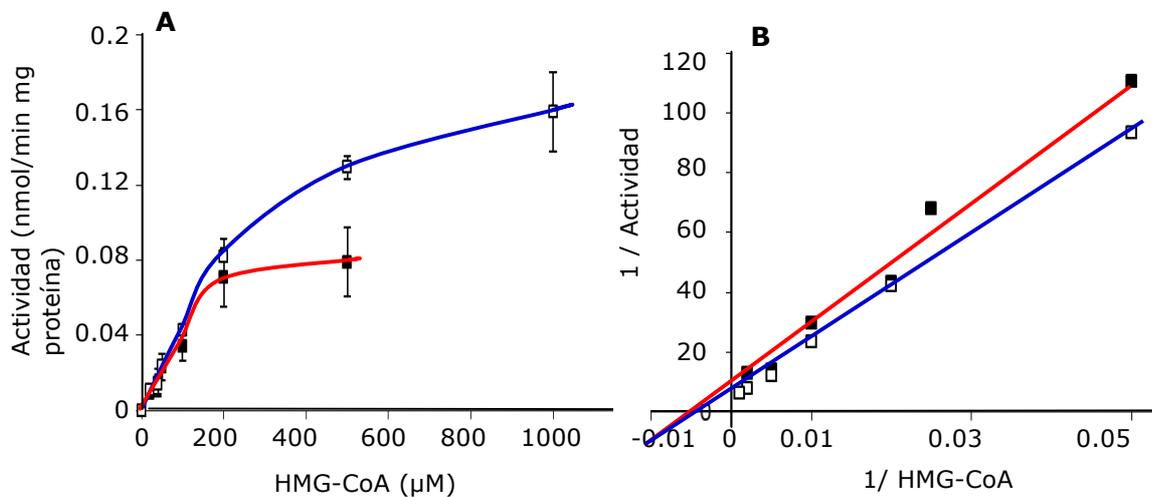


Figura 4.45. A. Curva de actividad de la fracción mitocondrial del testículo humano a pH 8 (línea roja) y pH 9 (línea azul). B. Representación de dobles inversos de los datos de la curva de la fig 4.45.A.

Los valores de V_{max} y K_{m} obtenidos en las fracciones citosólica y mitocondrial son comparables a los de la HL-Like1 y HL clonadas, aunque existen algunas diferencias entre ellos.

En el caso de la fracción citosólica + retículo, aunque los valores de V_{max} son bastante constantes a ambos pHs, son un poco superiores a pH 9.

Un comportamiento parecido se encuentra al analizar los datos de K_m que también son superiores a pH 9. Sin embargo, cuando se comparan los datos de $\Delta V_{max}/K_m$ entre la proteína HL-Like1 clonada y la fracción citosólica + retículo, estos son parecidos, lo que sugiere que los valores cinéticos obtenidos en ambas muestras son comparables.

En la fracción mitocondrial el valor de V_{max} es mayor a pH 9 que a pH 8, al igual que reportó Wanders en 1988 para fibroblastos humanos. Por el contrario, los valores de K_m siguen el mismo patrón de la HL clonada, aunque con diferencias menos acusadas. Cuando se comparan los valores de $\Delta V_{max}/K_m$ entre la proteína HL clonada y la fracción mitocondrial, los datos obtenidos son parecidos, lo que permite sugerir que los datos cinéticos obtenidos entre ambas muestras también son comparables.

	<i>pH</i>	HL	HL-Like1	Mitocondria	Citosol + retículo
^aV_{max}	9	50	12	0.17	0.027
	8	145	25	0.08	0.024
^bΔV_{max}	8→9	2.9	2.08	0.47	0.88
^cK_m	9	25	40	175	190
	8	140	75	200	175
^bΔK_m	8→9	5.6	1.87	1.14	0.92
V_{max}/K_m	9	2	0.3	$9.71 \cdot 10^{-5}$	$1.42 \cdot 10^{-5}$
	8	1.03	0.33	$4 \cdot 10^{-5}$	$1.37 \cdot 10^{-5}$
^b$\Delta V_{max}/K_m$	8→9	0.515	1.1	0.41	0.96

Tabla 4.8. Efecto del pH en las constantes cinéticas de la HL, HL-Like1 y HMG-CoA liasas mitocondrial y citosólica.

a. Máxima actividad específica expresada en nmol / min mg proteína. b. Δ calculada como una razón entre los valores a pH 8 vs. pH 9. c. K_m expresada en μM .

4.5.1.2. Actividad liasa de la proteína HL-Like1 del6

La abundancia de variantes de splicing del gen *HMGCLL1* sugiere la existencia de proteínas alternativas a la HL-Like1, que pueden presentar actividad liasa. Como todas las variantes llevaban asociada la pérdida del exón 6, se decidió expresar y medir la actividad de esta variante.

La mutagénesis para generar la delección del exón 6 se realizó a partir del plásmido recombinante HL-Like1-pMAL-c2x. Esta variante provoca la pérdida de 32 aminoácidos, sin alterar el marco de lectura. Tras la transformación en células *E. coli* XL1blue y posterior extracción del DNA

plasmídico, se comprobó mediante secuenciación la delección de 96 pb. El resultado obtenido se muestra en la figura 4.46.

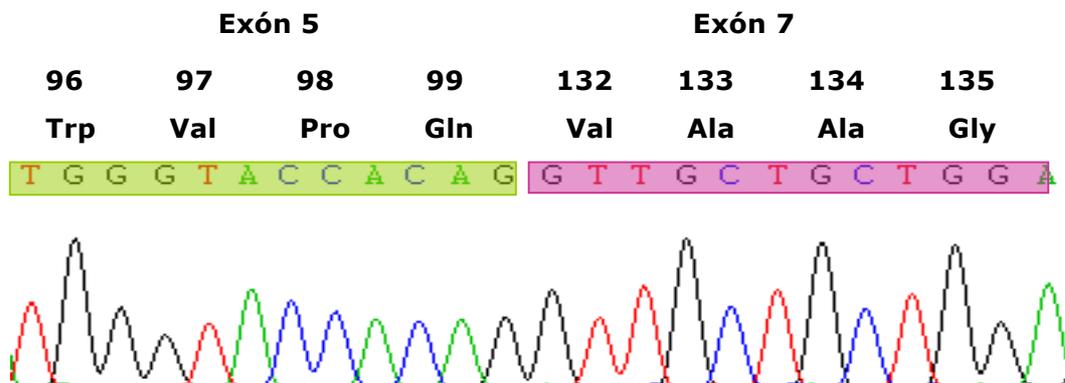


Figura 4.46. Secuencia del plásmido HL-Like1-pMAL con delección del exón 6.

A pesar de obtener clones delecionados y de transformarlos en la cepa BL21, no se consiguió sobreexpresar (figura 4.47) y medir actividad de la enzima.



Figura 4.47. Western-blot de las proteínas HL-Like1 wild-type y delecionada.

4.5.2. ENSAYO DE ACTIVIDAD LIASA SOBREENPRESADA EN CULTIVOS CELULARES

Teniendo en cuenta que las medidas de actividad se realizaban con la proteína clonada a la que le faltaba el péptido líder, se propuso comprobar si la proteína completa también poseía actividad liasa. Para ello, se clonaron a las proteínas HL-Like1 y HL en un vector de expresión eucariota, para después transfectarlo en células HEK293 y poder así medir las variaciones de actividad en cultivos.

4.5.2.1. Clonaje de las enzimas HL-Like1 y HL en el vector pIRES2

Se aplicó la misma metodología y comprobaciones que en el apartado 4.3.1. Las únicas variaciones fueron que en este caso se clonó el cDNA de ambos genes completo, desde el codón de inicio ATG, hasta el de STOP.

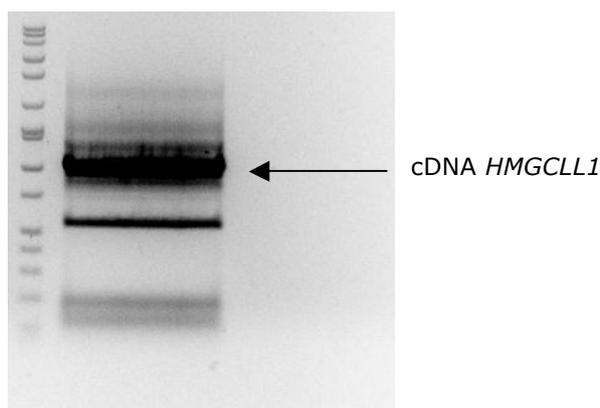


Figura 4.48. Amplificación del cDNA de la proteína HL-Like1.

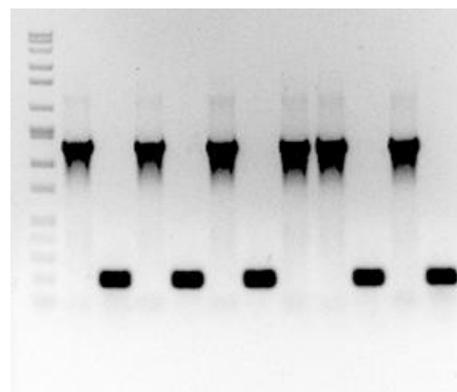


Figura 4.49. PCR boiling de las colonias transformadas con el plásmido HL-Like1-pIRES2.

En la amplificación del cDNA completo del gen *HMGCLL1* también aparecieron otras bandas que se correspondían con las variantes de *splicing* comentadas anteriormente. Por esta razón la purificación de la banda de ~1000 pb se realizó a partir del gel.

Finalmente se comprobaron 11 colonias de las cuales 6 resultaron positivas. Se aisló el DNA plasmídico y se comprobó que la secuencia fuese correcta.

Para el plásmido recombinante HL-pIRES2 se realizaron las mismas comprobaciones.

4.5.2.2. Actividad en cultivos eucariotas

Se transfectaron los plásmidos recombinantes: HL-Like1-pIRES2, HL-pIRES2 y pIRES2, en las células HEK293. Pasadas 48 horas tras la transfección se recogieron las células y se realizaron las medidas de actividad siguiendo la metodología descrita por Wanders (1988) y empleada en los apartados 4.5.1.1 y 4.5.1.2.

Los valores de actividad obtenidos con la transfección del plásmido vacío se tomaron como control, ya que se correspondían con la actividad de la liasa endógena de las células. Los resultados mostraron un aumento de la actividad liasa de los diferentes cultivos en dependencia del plásmido transfectado. Los valores obtenidos en los cultivos transfectados con el plásmido HL-Like1-pIRES2 mostraron un aumento del $46 \pm 17\%$ de actividad respecto al control. Cuando se transfectó al plásmido HL-pIRES2 el aumento de actividad liasa fue del $84 \pm 9\%$ respecto al valor control.

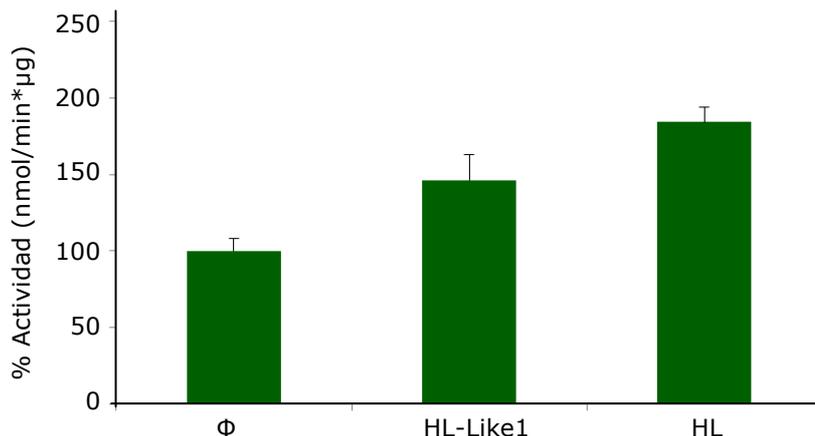


Figura 4.50. Actividad liasa de los diferentes cultivos transfectados. Los datos están presentados con \pm SEM (n=4).

Estos datos confirmaron el mayor nivel de actividad de la enzima HL respecto a la HL-Like1, además de validar a los cultivos celulares HEK293 como un modelo para el estudio de la proteína HL-Like1.

Aparte de los datos de actividad obtenidos, los resultados de western-blot confirmaron que la proteína HL-Like1 se sobreexpresaba en los cultivos eucariotas.



Figura 4.51. Western-blot de los cultivos con los plásmidos transfectados, revelado con el anticuerpo anti-HL-like1.

NT: No Transfectado.

Φ: Plásmido vacío.

4.5.2.3. Actividad de la proteína HL-Like1 del6 en cultivos eucariotas

Se realizó una mutagénesis dirigida en el plásmido pIRES2 para obtener la HL-Like1 sin su exón 6 y comprobar si la pérdida de éste influía en la actividad de la proteína. Se realizaron las mismas comprobaciones que cuando se produjo el plásmido recombinante HL-Like1del6-pMAL.

Se transfectaron los plásmidos recombinantes: HL-Like1-pIRES2, HL-Like1del6-pIRES2 y pIRES2 en las células HEK293. Pasadas 48 horas tras la

transfección se recogieron las células y se realizaron las medidas de actividad siguiendo la metodología descrita por Wanders (1988).

Los resultados mostraron un aumento de la actividad liasa de los cultivos cuando se transfectaron con el plásmido HL-Like1, sin embargo si el plásmido transfectado era el HL-Like1del6 la actividad no aumentaba, indicando que la proteína HL-Like1del6 no era activa en un modelo de expresión eucariota.

Los valores obtenidos en los cultivos transfectados con el plásmido HL-Like1-pIRES2 mostraron un aumento en el nivel de actividad liasa del $41 \pm 28\%$, tomando como valor control el obtenido en los cultivos transfectados con el plásmido vacío (pIRES2), correspondiente a la actividad liasa endógena. Sin embargo, cuando se transfectó al plásmido HL-Like1del6 el nivel de actividad liasa disminuyó un $30 \pm 20\%$, respecto al control.

Estos datos confirman que la proteína HL-Like1 sin los aminoácidos que codificaban el exón 6 es inactiva y que las variantes de splicing que lo contienen (6 y 7, 6 a 8 y 6 a 9) no son funcionales.

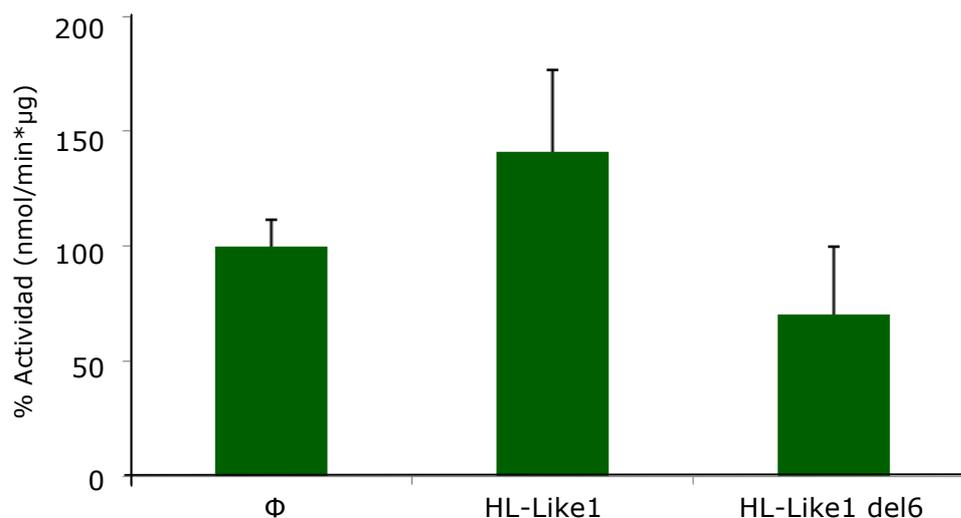


Figura 4.52. Actividad liasa de los diferentes cultivos transfectados. Los datos están presentados con \pm SEM (n=4).

Además de los datos de actividad obtenidos, los resultados de western-blot también mostraron sobreexpresión de las proteínas HL-Like1 y HL-Like1-del6 en estos cultivos eucariotas.



Figura 4.53. Western-blot de los cultivos con los plásmidos transfectados, revelado con el anticuerpo anti-HL-like1.
Φ: Plásmido vacío.

4.5.3. ENSAYO DE ACTIVIDAD LIASA EN DISTINTAS FRACCIONES SUBCELULARES DE TEJIDOS HUMANOS

Los resultados previos de localización subcelular nos indicaban que la proteína HL-Like1 se encontraba en retículo endoplásmico. Por ello se realizó un fraccionamiento subcelular de tejidos humanos para luego medir la actividad de las distintas fracciones.

4.5.3.1. Actividad liasa en la fracción citosólica de distintos tejidos humanos

Los resultados previos de localización subcelular indicaban que la proteína HL-Like1 se encontraba en retículo endoplásmico y que se podía unir y desunir a la membrana con facilidad. Por ello, se realizaron las medidas de actividad en la fracción citosólica por incluir también al retículo.

Los resultados obtenidos para los tejidos hígado, páncreas, testículo, ovario, cerebro y músculo esquelético quedan reflejados en la siguiente figura 4.54.

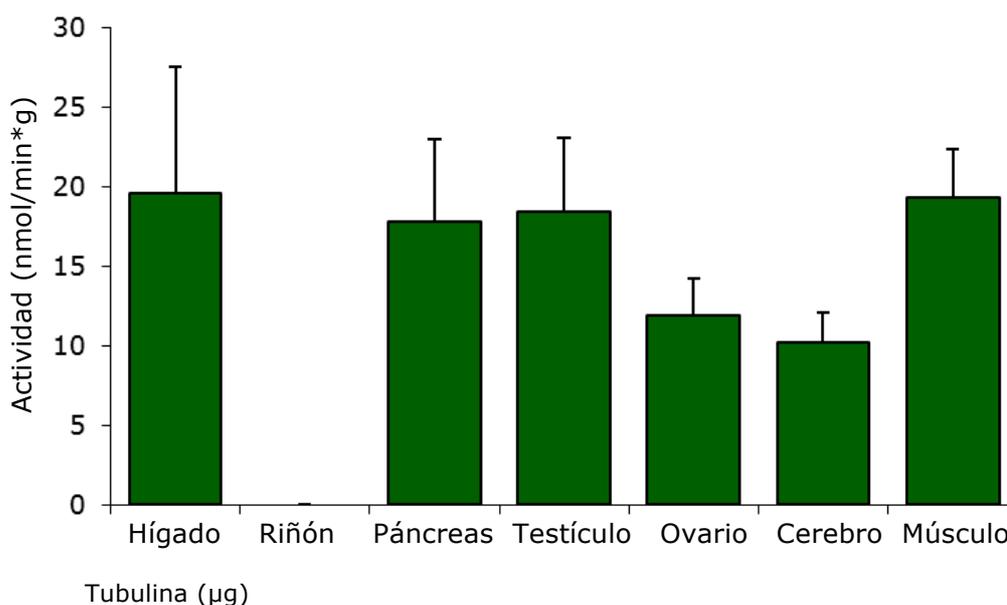


Figura 4.54. Actividad liasa medida espectrofotométricamente en la fracción citosólica de los tejidos humanos. Los datos están presentados con

Teniendo en cuenta que los valores son bajos, no parece que haya un tejido que destaque sobre los demás. El tejido con una mayor actividad liasa en citosol es el hígado (19.55 ± 8 mU/g tejido), seguido muy de cerca por el músculo (19.31 ± 3 mU/g, 98.7%), testículo (18.42 ± 4 mU/g, 94%), y páncreas (17.84 ± 5 mU/g, 91.2%). El ovario (11.94 ± 2 mU/g, 61%) y cerebro (10.24 ± 2 mU/g, 52%) presentan menos actividad que el resto, y en riñón no parece haber actividad.

4.5.3.2. Actividad liasa en la fracción mitocondrial de distintos tejidos humanos.

Siguiendo la misma metodología que en el punto anterior se midió la actividad liasa de la fracción mitocondrial de diferentes tejidos humanos.

Los resultados obtenidos para los tejidos hígado, riñón, páncreas, testículo, corazón, cerebro y músculo quedan reflejados en la siguiente figura 4.55.

El hígado es el tejido con una mayor actividad liasa en la fracción mitocondrial (128.86 ± 16 mU/g tejido), seguido por el páncreas (58.49 ± 6 mU/g, 45%), riñón (42.48 ± 8 mU/g, 33%), testículo (20.23 ± 4 mU/g, 16%), músculo esquelético (12.6 ± 3 mU/g, 9,7%) y corazón (4.02 ± 2 mU/g, 3%). No se detecta actividad HL en cerebro.

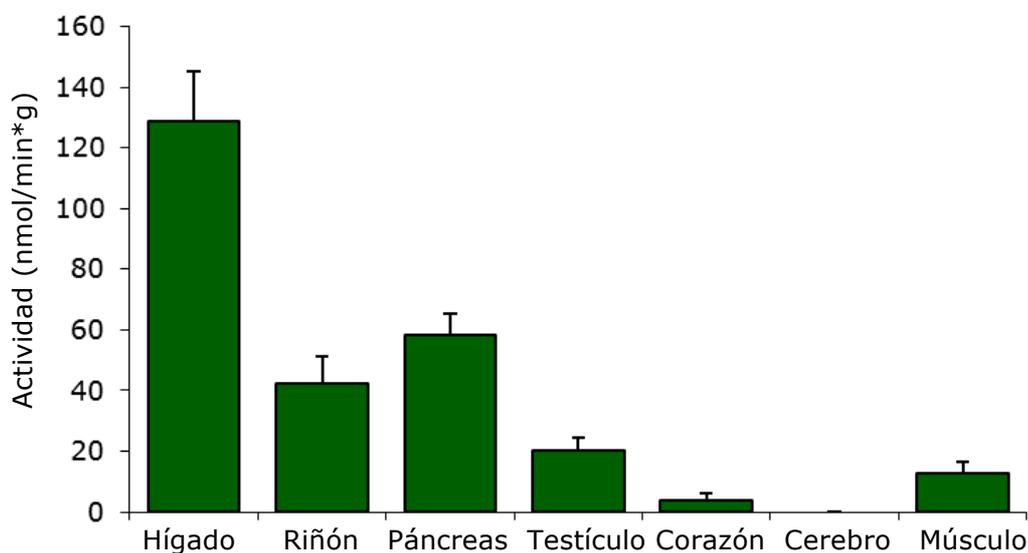


Figura 4.55. Actividad liasa medida espectrofotométricamente en la fracción mitocondrial de los tejidos humanos. Los datos están presentados con \pm SEM (n=4).

En la tabla 4.9 aparecen todos los datos obtenidos en ambas fracciones subcelulares, y en la figura 4.56 se comparan todos los datos de actividad de ambas fracciones subcelulares por tejidos. Se observa que en

todos los tejidos analizados, excepto cerebro y músculo esquelético, el nivel de actividad liasa correspondiente a la fracción mitocondrial supera al de la fracción citosólica.

Actividad (nmol/min*g de tejido)		
	Mitocondria	Citosol
Hígado	128.86	19.55
Riñón	42.49	0
Páncreas	58.49	17.84
Testículo	20.23	18.42
Corazón	4.02	-
Ovario	-	11.95
Cerebro	0	10.24
Músculo	12.6	19.32

Tabla 4.9. Datos de actividad liasa de los diferentes tejidos y fracciones subcelulares.

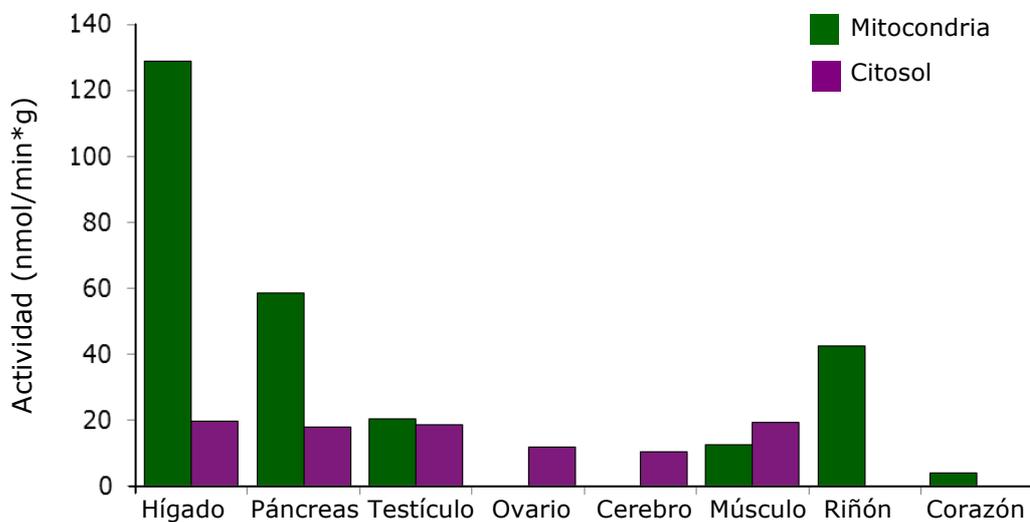


Figura 4.56. Comparación de las actividades liasa de los distintos tejidos en las dos localizaciones subcelulares.

4. 6. Desarrollo de anticuerpos específicos contra la proteína HL-Like1.

El desarrollo de anticuerpos específicos contra la proteína HL-Like1 se planteó ante la ausencia de anticuerpos comerciales para poder avanzar en su investigación. Sin embargo, la gran homología entre las proteínas HL-Like1 y HL dificultaba su obtención. Por esta razón se planteó el desarrollo de un anticuerpo contra un péptido concreto y diferente de la HL-Like1.

En el momento de la escritura de esta tesis ya existían varias casas comerciales que poseían anticuerpos contra la proteína HL-Like1.

4.6.1. OBTENCIÓN DEL ANTICUERPO ANTI-HL-LIKE1.

Esta metodología fue desarrollada por la empresa Abyntek Biopharma S.L. Nosotros les proporcionamos la secuencia del péptido a inmunizar en los conejos y ellos desarrollaron todo el proceso. Nos enviaron una tabla donde mostraban los resultados de la inmunización y de la purificación de IgG a partir de los sueros de conejo precipitados en sulfato amónico, la foto de un gel de poliacrilamida donde se indicaba la purificación de las IgG por cromatografía de afinidad con el péptido y las muestras obtenidas.

Los datos recibidos se muestran a continuación.

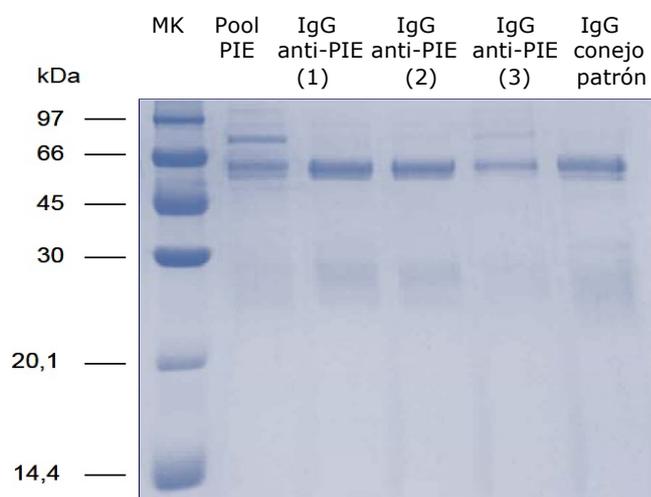


Figura 4.57. Análisis mediante SDS PAGE 10% de la purificación de IgG por cromatografía de afinidad con el péptido PIE (2 μ g de proteína/calle).

Inmunógeno	Muestra	Sangrado / Muestra de partida	Forma	Título* frente a péptidos	Volumen (ml)	Concentración IgG (mg/ml)
Péptido PIE- KLH	PIE A (Conejo A)	Preimmune	Suero	0	0,36	
		PIE A1	SO ₄ (NH ₄) ₂ 33%	512.000	6,3	
		PIE A2	SO ₄ (NH ₄) ₂ 33%	2.048.000	6,6	
	PIE B (Conejo B)	Preimmune	Suero	0	0,37	
		PIE B1	SO ₄ (NH ₄) ₂ 33%	512.000	6,5	
		PIE B2	SO ₄ (NH ₄) ₂ 33%	2.048.000	6,3	
	Pool PIE	PIE (A1 + A2 + B1 + B2)	PBS	1.024.000	27	25,55
	IgG anti-PIE (1)	Pool PIE	PBS-N₃Na 0,02%	8.192.000	1,6	7,063
	IgG anti-PIE (2)	Pool PIE	PBS-N₃Na 0,02%	4.096.000	1,25	3,215
	IgG anti-PIE (3)	Pool PIE	PBS-N₃Na 0,02%	128.000	7,25	0,45

Tabla 4.10. Resultados de la inmunización y de la purificación de IgG a partir de los sueros de conejos precipitados en sulfato amónico.

* El título representa el inverso de la dilución más alta cuyo valor de densidad óptica a 490nm (DO) es igual o superior al doble del valor de DO desarrollado por la reactividad de los anticuerpos secundarios (anti-IgG de conejo-HRPO) sobre el péptido fijado en la placa de ELISA a una concentración de 1 µg/ml.

En letra negrita se indican los productos finales entregados.

Los sueros preinmunes de los conejos se entregan como pool (A + B)

4.6.2. ESTUDIO DE LA ESPECIFICIDAD DEL ANTICUERPO ANTI-HL-LIKE1

Para comprobar la eficacia del anticuerpo diseñado se realizaron diferentes experimentos que validaran su especificidad.

4.6.2.1. Comprobación con la proteína HL-Like1 clonada

Lo primero que se comprobó fue si el anticuerpo era capaz de reconocer a la proteína HL-Like1 y no presentaba cruce con la proteína HL. Ambas enzimas de partida habían sido obtenidas mediante sobreexpresión y purificación en un modelo bacteriano.

Aunque a estas proteínas clonadas les faltaba el péptido líder, la secuencia contra la que iba dirigida el anticuerpo no se encontraba en esa zona de la proteína, por lo que se consideraron válidas para testar el anticuerpo.

Los resultados de western-blot obtenidos se muestran a continuación.



Figura 4.58. Western-blot revelado con un anticuerpo específico para la proteína HL-Like1. No se observa reactividad con la proteína HL.

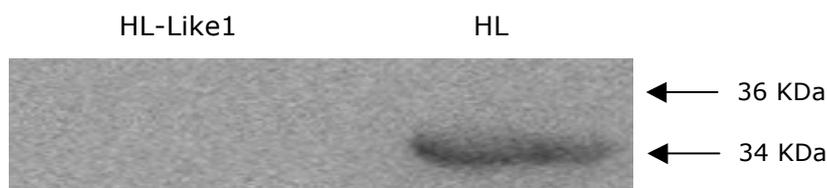


Figura 4.59. Western-blot revelado con un anticuerpo específico para la proteína HL. No se observa reactividad con la proteína HL-Like1.

Además se realizó un western-blot con cantidades crecientes de la proteína HL-Like1 en el que se comprobó como el marcaje de la proteína se hacía más intenso a medida que se aumentaba la cantidad de la misma. El resultado se muestra en la siguiente figura.

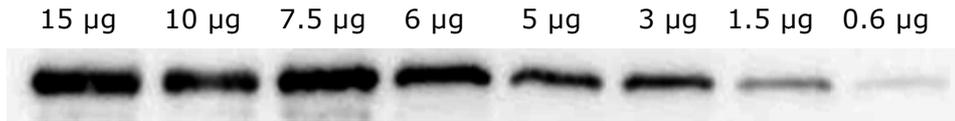


Figura 4.60. Western-blot con cantidades decrecientes de la proteína HL-Like1.

Estos experimentos demuestran que el nuevo anticuerpo no presenta reactividad cruzada con la proteína HL clonada, reconociendo únicamente a la proteína HL-Like1 clonada. Además, el anticuerpo es capaz de distinguir entre diferentes cantidades de proteína HL-Like1.

4.6.2.2. Inmunofluorescencia sobre cultivos HEK293 para visualizar la proteína HL-Like1 endógena

Para comprobar si el anticuerpo reconocía a la proteína HL-Like1 endógena de cultivos se realizó una inmunofluorescencia sobre cultivos celulares HEK293.

Anteriormente a la inmunofluorescencia, se transfectó el plásmido comercial pDsRed2-ER (Clontech) que llevaba la proteína calreticulina (específica de retículo endoplasmático), fusionada a la proteína fluorescente roja. Al transfectar las células con este plásmido, se marcó específicamente el retículo de las mismas.

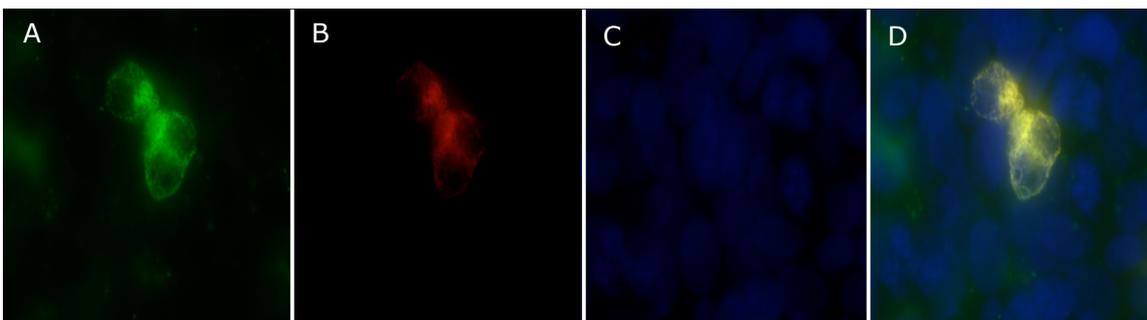


Figura 4.61. Inmunofluorescencia y co-localización en células HEK293. A. Anticuerpo anti-HL-Like1 marcado en verde. B. Plásmido comercial ER-pDSRed-N1 que marca el retículo endoplásmico en rojo. C. Marcaje de los núcleos de las células en azul con el reactivo Hoechst. D. Superposición de las imágenes anteriores

Las imágenes muestran que se produce la colocalización entre el marcador de retículo y la proteína HL-Like1. En la figura 4.61.A se ve la localización subcelular de la proteína HL-Like1 proporcionada por el anticuerpo anti-HL-Like1 (verde) y en la figura 4.61.B la del plásmido

comercial pDsRed2-ER (rojo) (Clontech), que indica de manera específica la localización del retículo endoplásmico dentro de estas células. La imagen 4.61.C muestra el marcaje específico de los núcleos de las células HEK293. Por último en la figura 4.61.D se indica la superposición de las tres imágenes anteriores. Esta figura muestra la colocalización entre la proteína HL-Like1 y el retículo endoplásmico. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en la sobreexpresión de la proteína HL-Like1 fusionada a la EGFP (ver apartado 4.3.2).

4.7. Localización por tejidos de las proteína HL-Like1 y HL.

Uno de los objetivos que se pretendía alcanzar con el desarrollo del anticuerpo anti-HL-Like1 era realizar experimentos sin reactividad cruzada con la proteína HL y así poder diferenciar a ambas isoenzimas de manera inequívoca.

Teniendo en cuenta que los datos previos de Real-Time PCR (Tesis Sebastián Menao Guillén, 2006), ya indicaban un patrón distintivo entre ambos genes en cuanto al nivel de expresión de su mRNA por tejidos, se planteó conocer si este patrón diferencial también se encontraba a nivel de las proteínas.

4.7.1. LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA HL-LIKE1 EN DIFERENTES FRACCIONES SUBCELULARES DE DISTINTOS TEJIDOS HUMANOS ADULTOS

Se tomó como material a analizar a la membrana de la casa comercial ProSci "Human Normal Tissue Blot II", la cual tenía transferidos en cada una de sus calles 15 µg de un homogenado total de diferentes tejidos humanos adultos. Los resultados se muestran en la siguiente figura.



Figura 4.62. Amplificación de la zona correspondiente a los 36 KDa del western-blot de un homogenado total de diferentes tejidos.

El pulmón fue el tejido con un mayor nivel de expresión de la proteína HL-Like1. La cuantificación de las manchas del western-blot proporcionó los siguientes datos del nivel de expresión: pulmón (100%), riñón (56.9%),

corazón (37.2%), cerebro (31.4%), hígado (19.4%), páncreas (18.2%), músculo esquelético (6.4%), piel (3.6%) y bazo (0.6%).

4.7.2. LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA HL-LIKE1 EN DISTINTOS TEJIDOS HUMANOS FETALES

Para comprobar si existía un patrón de expresión diferencial entre los tejidos adultos y fetales de la proteína HL-Like1 se realizó un western-blot sobre un homogenado total de diferentes tejidos fetales. Los resultados se muestran a continuación.



Figura 4.63. Amplificación de la zona correspondiente a los 36 KDa del western-blot de un homogenado total de diferentes tejidos.

Los resultados mostraron que existía una proteína al tamaño esperado (36 KDa) correspondiente con el tamaño de la HL-Like1 en tejidos fetales.

En este caso fue el cerebro el tejido con un mayor nivel de expresión de la proteína HL-Like1, como mostraron las manchas obtenidas en los carriles correspondientes a las cortezas motora y frontal. La cuantificación de las manchas del western-blot proporcionó los siguientes datos de nivel de expresión: corteza motora (100%), corteza frontal (91.3%). El resto de tejidos, pulmón, riñón, músculo esquelético, corazón, hígado y páncreas, no expresaban la proteína HL-Like1, al menos al nivel de detección de la técnica.

4.7.3. LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA HL EN DISTINTOS TEJIDOS HUMANOS ADULTOS.

Aunque el nivel de expresión del gen *HMGCL* había sido analizado por diversos grupos, el nivel de expresión de la proteína HL no se conocía demasiado bien. Por esta razón, se planteó estudiar el patrón de expresión diferencial por tejidos de la proteína HL y comparar este con el de la proteína HL-Like1.

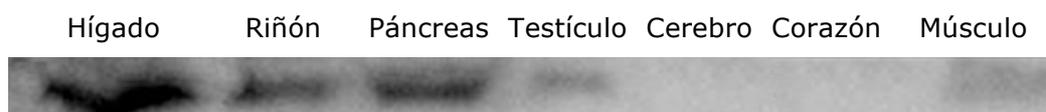


Figura 4.64. Western-blot de la fracción mitocondrial de distintos tejidos humanos revelado con el anticuerpo anti-HL comercial.

Los resultados del western blot en distintos tejidos humanos se muestran en la siguiente figura. El mayor nivel de proteína HL se encontró en hígado (100%), seguido por páncreas (89%), testículo (60%), riñón (42%) y músculo esquelético (36%). Una señal muy débil se detectó en corazón (2%) y cerebro (1.8%).

4.7.4. LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA HL EN DISTINTOS TEJIDOS HUMANOS FETALES

Hasta la fecha no existían estudios que explorasen el nivel de proteína HL en tejidos fetales humanos. Por esta razón se planteó el estudio del nivel de expresión de esta proteína en los mismos. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente figura.

Sólo en pulmón y riñón fetales apareció un nivel significativo de proteína HL humana. En el resto de tejidos la proteína HL parecía no expresarse.

Motora Frontal Pulmón Riñón ME Corazón Hígado Páncreas

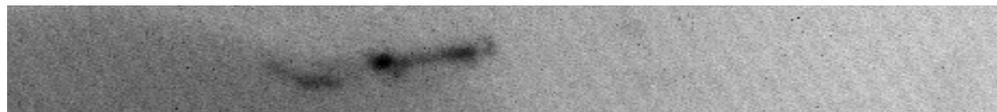


Figura 4.65. Western-blot de un homogenado de tejidos fetales revelado con el anticuerpo anti-HL.

4.8. Estudio de interacción de las proteínas HL-Like1 y tubulina

El estudio de la interacción de las proteínas HL-Like1 y tubulina se planteó mediante varios abordajes. Lo primero que se debía hacer era comprobar si se producía una interacción real y directa entre ambas proteínas para posteriormente, intentar conocer cómo y a través de qué parte de la estructura se podía producir dicha interacción, y si la misma afectaba a alguna característica de la enzima HL-Like1.

4.8.1. COINMUNOPRECIPITACIÓN DE LA HL-LIKE1 Y LA TUBULINA

Los experimentos de coinmunoprecipitación tenían la finalidad de conocer si se producía una interacción directa entre dos proteínas *in vitro*. En nuestro caso se realizó para comprobar la interacción entre la tubulina y la HL-Like1.

Se emplearon dos estrategias, en la primera, se unió el anticuerpo anti-DM1A (que reconoce a la tubulina) a una columna de sepharosa y se reveló el western-blot con el 1º anticuerpo anti-HL (anticuerpo que reconocía tanto a la HL como a la HL-Like1). En la segunda, el anticuerpo que se unió a la columna de sepharosa fue el que reconocía a la proteína HL y se reveló el western-blot con el anticuerpo anti-DM1A que reconocía a la tubulina.

En la figura 4.66 se observa el resultado de la coimmunoprecipitación cuando se reveló con el anticuerpo anti-DM1A. La primera calle (LK-Gly) corresponde al control en el cual se pusieron en contacto la proteína HL-Like1 con una solución de glicina, para comprobar si se producía alguna reacción inespecífica. Lo mismo ocurría en la calle HL-Gly para la proteína HL. En las calles LK-DM1A y HL-DM1A, sólo se pusieron en contacto a las proteínas HL-Like1 y HL con la sepharosa, pero sin incubación con tubulina. En las siguientes calles se fue variando la cantidad de tubulina que se adicionaba en la mezcla de reacción.

LK	LK	LK	LK	LK	HL	HL	HL	HL	HL
Gly	DM1A	tub	tub	tub	Gly	DM1A	tub	tub	tub
		10 µl	20 µl	40 µl			10 µl	20 µl	40 µl



Figura 4.66. Co-inmunoprecipitación del complejo tubulina-HL-Like1 y tubulina-HL. El anticuerpo unido a la sepharosa es el anti-HL revelado con anti-DM1A. (LK: HL-Like1, tub: tubulina).

En la figura 4.67 se muestran las mismas mezclas de reacción anteriores, pero en este caso, el anticuerpo unido a la sepharosa es el anti-DM1A y se ha revelado con el anticuerpo anti-HL.

LK	LK	LK	LK	LK	HL	HL	HL	HL	HL
Gly	DM1A	tub	tub	tub	Gly	DM1A	tub	tub	tub
		10 µl	20 µl	40 µl			10 µl	20 µl	40 µl



Figura 4.67. Co-inmunoprecipitación del complejo tubulina-HL-Like1 y tubulina-HL. El anticuerpo unido a la sepharosa es el anti-DM1A revelado con anti-HL. (LK: HL-Like1, tub: tubulina).

Los resultados mostraron que se producía una interacción entre la HL-Like1 clonada y la tubulina obtenida de cerebro de rata. La proteína HL también interaccionaba con la tubulina, esto podía deberse a la gran

homología estructural que existe entre ambas proteínas ya que estos experimentos se realizaron *in vitro*.

4.8.2. CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS HL Y HL-LIKE1 SIN LA HÉLICE ALFA 12

Teniendo en cuenta que los programas bioinformáticos predecían una posible interacción entre la HL-Like1 y la tubulina a través de la hélice alfa 12 de la primera, se propuso comprobar si la interacción se producía por esta región de la proteína. Para ello, se clonaron las proteínas HL-Like1 y HL sin su hélice alfa 12 y se sobreexpresaron en un modelo procarionta.

4.8.2.1. Clonaje de las proteínas HL-Like1 y HL sin la hélice α -12

Para realizar este clonaje se partió del cDNA obtenido durante los clonajes anteriores de las proteínas HL-Like1 y HL (primera PCR realizada a partir de los paneles comerciales). A partir de él, usando los primers específicos que eliminaban la hélice alfa 12 de las proteínas, se amplificó el fragmento de interés por medio de una PCR.

De esta manera se obtuvo un inserto de 869 pb, tamaño que se correspondía con el de la proteína HL-Like1 sin su péptido líder ni los últimos nueve aminoácidos que forman la hélice alfa 12, como queda reflejado en la figura 4.68.

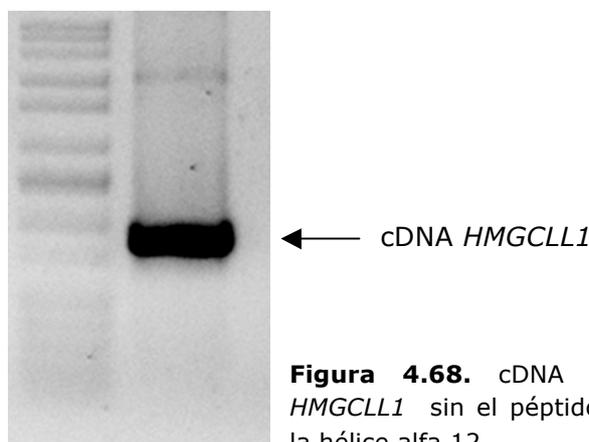


Figura 4.68. cDNA del gen *HMGCLL1* sin el péptido líder ni la hélice alfa 12.

Posteriormente, se digirió el inserto con las enzimas EcoRI y BamHI, generando así extremos cohesivos para ligarlo al vector pMAL-c4x que también se digirió con las mismas enzimas de restricción.

Tras la ligación y transformación bacteriana, se comprobaron por PCR 13 colonias de las cuales resultó positiva sólo una de ellas (Figura 4.69).

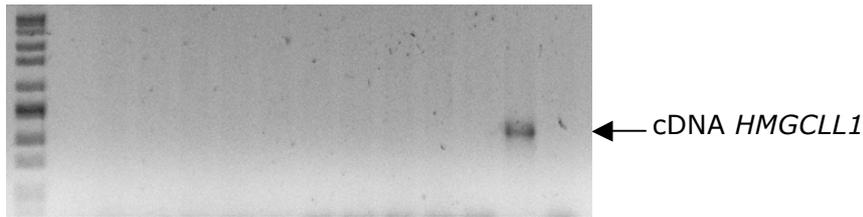


Figura 4.69. Electroforesis donde se observa el resultado de la PCR-boiling de las colonias *E. coli* XL1blue.

Los resultados obtenidos en el clonaje de la proteína HL sin la hélice alfa 12 fueron también positivos.

4.8.2.2. Expresión y purificación de las proteínas HL-Like1 sin péptido líder sin hélice α -12

Para la expresión del DNA recombinante se eligió la cepa de *E. coli* BL-21 Codon Plus (DE3)-RIPL, libre de proteasas y que codifica tRNAs poco frecuentes en *E. coli*. Se ensayaron diversas condiciones de expresión, con distintas temperaturas de incubación, a distintos tiempos, concentraciones de IPTG y D.O_{600nm}. Ninguna de las condiciones produjo una proteína soluble, como queda reflejado en la figura 4.70.

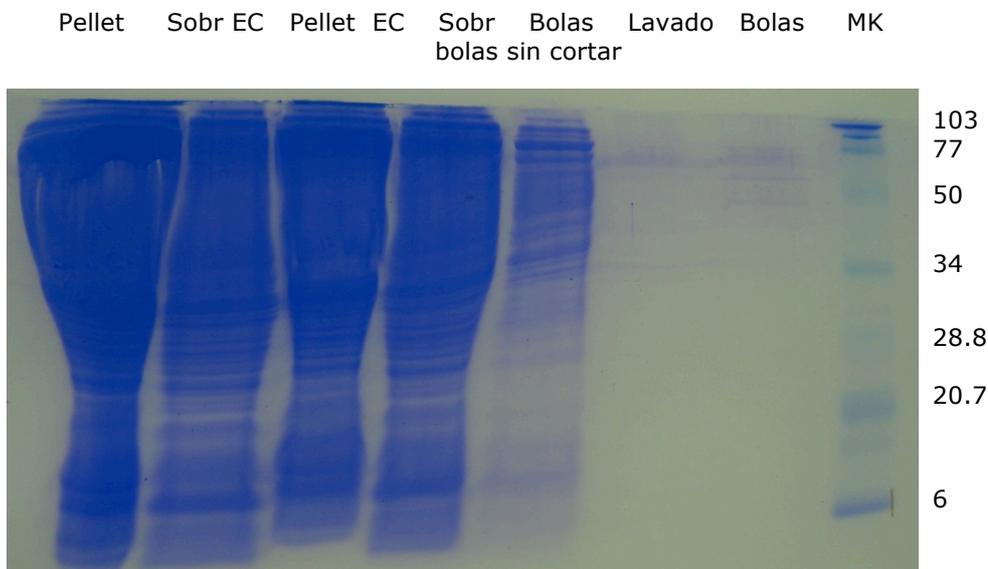


Figura 4.70. Gel SDS-PAGE con las distintas fracciones generadas en la expresión y purificación de la proteína HL-Like1 sin péptido líder sin hélice α 12.

En la figura 4.70 se ven distintas muestras tomadas a lo largo del proceso de purificación de la proteína HL-Like1 sin su hélice α -12. En la

última fracción obtenida (correspondiente a la calle denominada "bolas") no aparece ninguna banda de proteínas a la altura de 34 KDa, esto indica que la proteína no se sobreexpresa en un modelo procariota o, que si lo hace, no se produce de manera soluble.

4.8.2.3. Expresión y purificación de las proteínas HL-Like1 con péptido líder sin hélice α -12

Se realizaron las mismas pruebas descritas en el punto 4.8.2.2 con idénticos resultados.

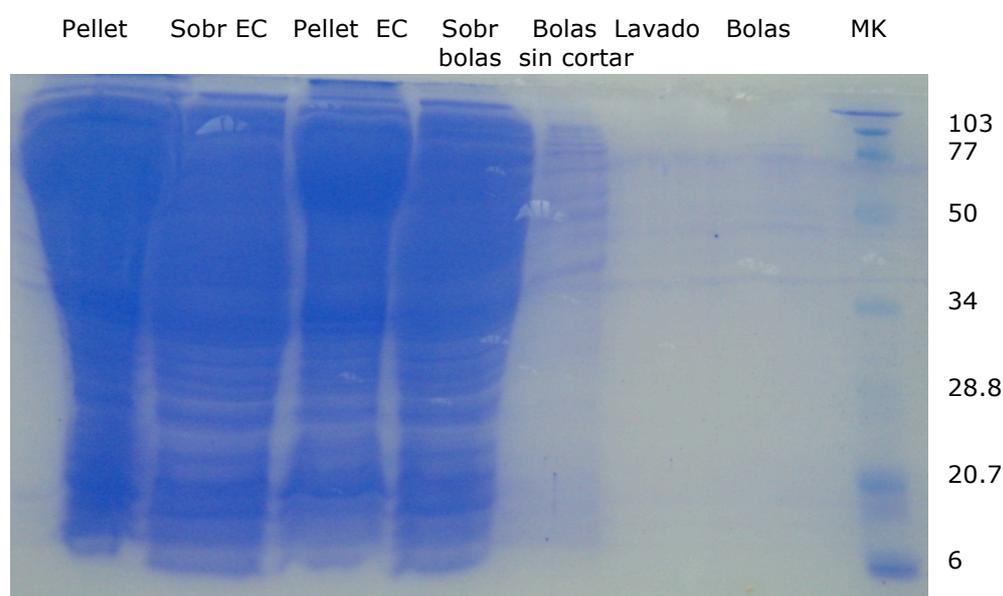


Figura 4.71. Gel SDS-PAGE con las distintas fracciones generadas en la expresión y purificación de la proteína HL-Like1 con péptido líder sin hélice α 12.

4.8.2.4. Expresión y purificación de la proteína HL sin péptido líder ni hélice α -12

Se realizaron las mismas pruebas que las indicadas en el punto 4.8.2.2. En este caso se consiguieron unas condiciones óptimas de inducción y de lisis celular que son las que se indican en el punto 3.5 de Material y Métodos.

En la figura 4.72 se observa la expresión de la proteína de fusión MBP-HL sin hélice α -12 en la parte soluble. Después de purificarla, siguió apareciendo la banda correspondiente a esta proteína de fusión. Finalmente, después de digerir con la proteasa Factor Xa, apareció una banda de aproximadamente 34 kDa que se correspondía con la HL sin la hélice α -12.

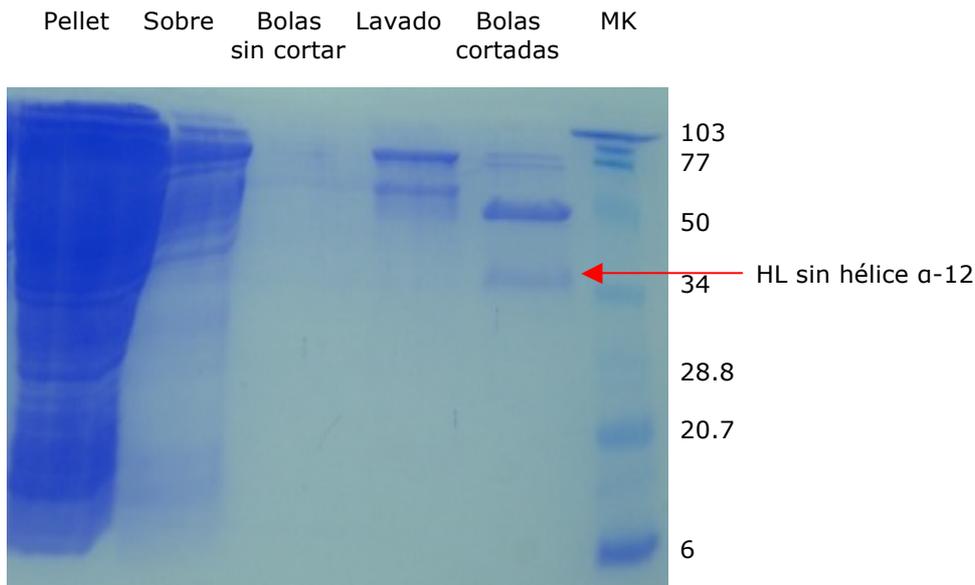


Figura 4.72. Gel SDS-PAGE con las distintas fracciones generadas en la expresión y purificación de la proteína HL- sin péptido líder ni hélice α 12.

4.8.3. ESTUDIOS DE ACTIVACIÓN DE LAS PROTEÍNAS HL-LIKE1 Y HL POR PARTE DE LA TUBULINA.

Una vez obtenidas las proteínas clonadas, se realizaron medidas de actividad liasa en presencia de tubulina. Estos experimentos se realizaron tanto con las proteínas HL-Like1 y HL enteras (sin su péptido líder), como con la proteína HL con su hélice α -12 delecionada.

Los resultados obtenidos se muestran en las siguientes figuras e indican que se produjo un aumento de la actividad liasa cuando ambas proteínas se encontraban juntas.

Se produjo un aumento paulatino y proporcional de la actividad de la enzima HL-Like1 cuando se encontraba con cantidades de concentración crecientes de tubulina, entre 0 y 300 μ g (Figura 4.73). Esto indicaba que la actividad liasa de la enzima HL-Like1 se podía modular por la tubulina.

La enzima HL también vio aumentada su actividad en presencia de tubulina *in vitro*. Se producía un aumento muy acusado de la actividad de la proteína HL, entre 0 y 30 μ g de tubulina, para después saturarse la mezcla de reacción. Este aumento de actividad no fue tan marcado como el que presentó la proteína HL-Like1 (Figura 4.74).

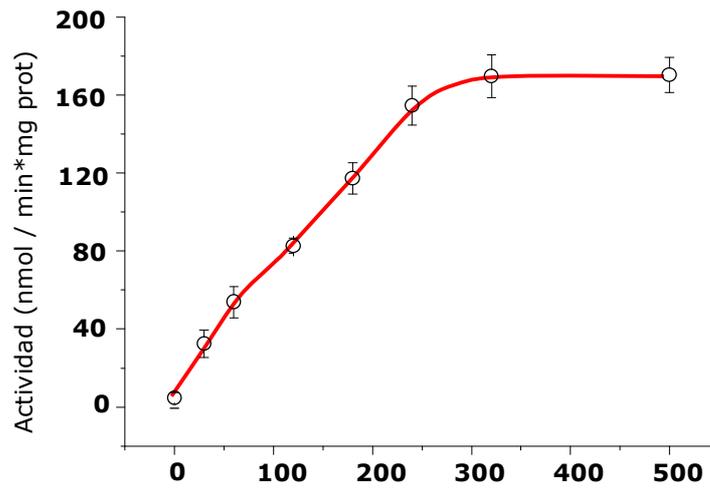


Figura 4.73. Curva de actividad donde se muestra el aumento de actividad liasa de la proteína HL-like1 cuando se encuentra en presencia de cantidades crecientes de tubulina.

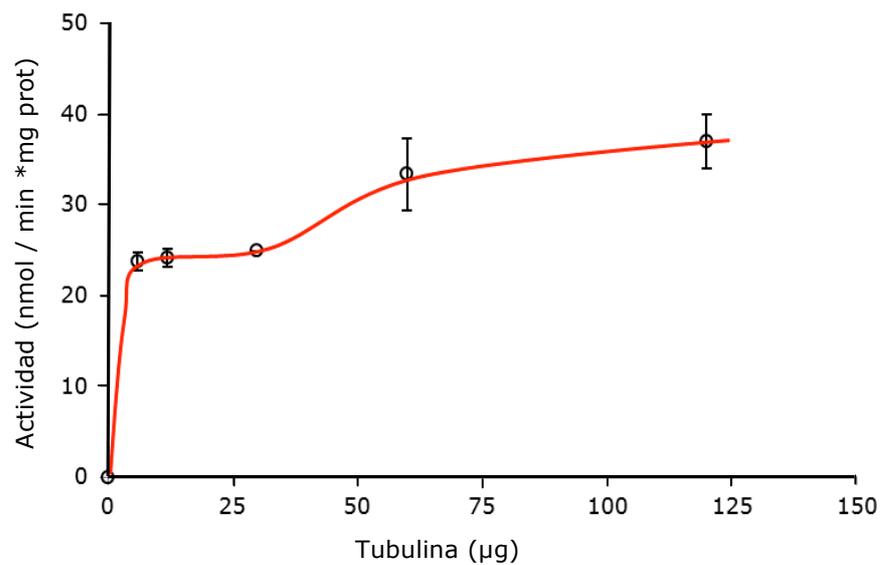


Figura 4.74. Curva de actividad donde se muestra el aumento de actividad liasa de la proteína HL cuando se encuentra en presencia de cantidades crecientes de tubulina.

También se realizaron medidas de activación por tubulina de la enzima HL sin su hélice α -12. Los resultados se muestran en la siguiente imagen.

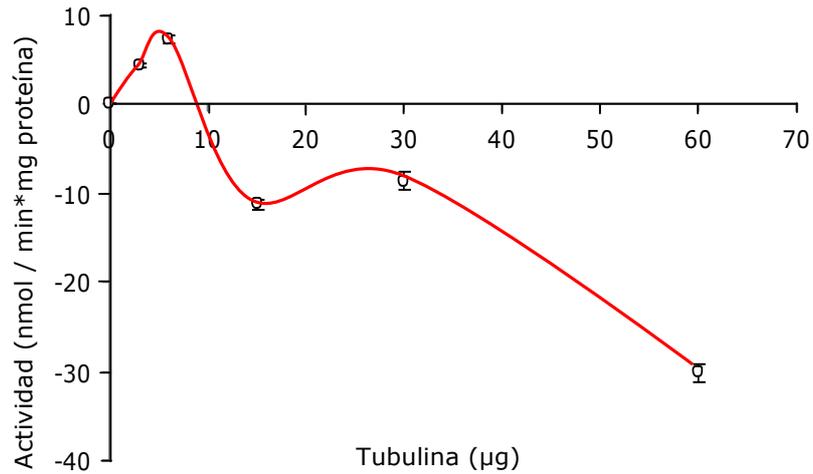


Figura 4.75. Curva de actividad donde se muestra la disminución de actividad liasa de la proteína HL mutada sin su hélice α -12 cuando se encuentra en presencia de cantidades crecientes de tubulina.

La enzima HL sin su hélice α -12 no vio incrementada su actividad en presencia de tubulina. Con cantidades pequeñas de tubulina se observó un aumento en su actividad pero es poco significativo si lo comparamos con los resultados obtenidos para la HL y HL-Like1 wild-type.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

5.1. Homología estructural entre las proteínas HL-Like1 y HL

La primera propuesta estructural de la proteína HL-Like1 fue realizada en la tesis de Sebastián Menao Guillén (2006). En este trabajo se utilizó el modelo bioinformático de la enzima HL como punto de partida para elaborar la nueva estructura (Casals et al., 2003). La gran similitud entre ambas facilitó este desarrollo, sin embargo, en el momento de hacer el estudio la HL todavía no había sido cristalizada, por lo que se trabajaba a partir de un modelo bioinformático de altas prestaciones (Casals et al., 2003). Una confirmación parcial de estas propuestas llegó con la cristalización de la HL por el grupo del Dr. J-J.P. Kim (Fu et al., 2006), pero a día de hoy, sigue faltando la cristalización de la HL-Like1 o estudios funcionales que confirmen el modelo de la enzima.

En esta tesis se ha planteado modificar el modelo estructural de la HL-Like1 con mutaciones homólogas a las de pacientes con deficiencia de HL (Menao et al., 2009). La idea es confirmar si mutaciones en aminoácidos clave de la estructura de ambas enzimas producen fallos de actividad similares. Experiencias parecidas se habían realizado en otras isoenzimas, como la HMG-CoA sintasa citosólica y mitocondrial. En este caso la transfección de la isoforma mHS en células auxótrofas para mevalonato, en las que no se había detectado actividad de la isoforma citosólica, sirvió para eliminar la auxotrofia de estas células (Ortiz et al., 1994) y confirmar de esta manera la gran homología estructural y funcional de ambas isoformas.

La comparación estructural de las proteínas HL y HL-Like1 ha mostrado que todos los aminoácidos importantes para la actividad catalítica y para la unión del catión divalente (Mg^{+2}) (Arg⁴¹, Asp⁴², Glu⁷², Tyr¹⁶⁷, Cys²⁶⁶, Asn²⁷⁵, His²³³ e His²³⁵) se encuentran conservados en ambas enzimas (Fu et al., 2006, 2010; Montgomery y Miziorko, 2011; Roberts et al., 1995, 1996; Tuinstra y Miziorko, 2003). Por esta razón, inicialmente se ha planteado la mutagénesis dirigida de dos aminoácidos que conforman el centro catalítico de la enzima, la Arg⁵⁶ y la His²⁴⁸, y que se corresponden respectivamente con la Arg⁴¹ y la His²³³ de la HL.

La elección de la Arg⁵⁶ se ha realizado porque la mutación de su homóloga en la HL (p.R41Q) es la causa más frecuente de aciduria 3-hidroxí-3-metilglutárica (Mitchell et al., 1998 (b); Ozand et al., 1991). Además, se conoce que los pacientes afectados tienen una falta total de actividad de la enzima (Mitchell et al., 1998 (b)). El ensayo enzimático ha demostrado que esta mutación también deja sin actividad a la enzima HL-Like1. La explicación del fenómeno es probablemente similar a la dada para la HL. Así, el cambio de la Arg⁵⁶, localizada en la interacción del sustrato con el centro activo, entre la lámina β 1 y la hélice α 1, por una glutamina, produce un cambio en el tamaño y carga del aminoácido que probablemente impide la correcta interacción del sustrato con el resto de los aminoácidos que forman el centro activo (Figura 4.7).

Una vez demostrado que una mutación que inactiva el centro activo de la HL puede producir efectos análogos en la HL-Like1, elegimos otro punto básico de la arquitectura de la enzima, la zona de unión del catión divalente (Mg^{+2}). Desde hace años, se conoce que la mutación p.H233R de la HL afecta a esta zona y produce la falta total de actividad (Roberts et al., 1996).

Según el modelo de la HL-Like1 la histina 233 de la HL se corresponde con la histidina 248. Este aminoácido se localiza en la lámina β 7 de la proteína HL-Like1, y creemos que dirige la coordinación con el catión divalente Mg^{+2} (Fu et al., 2006) (Figura 4.10). Su cambio por una arginina provoca una pérdida total de la actividad de la enzima, y sugiere que la unión al Mg^{+2} es imprescindible para la catálisis, igual que pasaba con la HL. (Kramer y Miziorko, 1980). Estos resultados vuelven a reforzar el adecuado diseño del modelo propuesto.

Con estos datos podemos afirmar que, mutaciones que implican directamente al centro activo de la HL y que por tanto, provocan la pérdida de actividad de la enzima, cuando son reproducidas, según modelo, en la enzima HL-Like1 son capaces de generar el mismo efecto.

Llegados a este punto, nos planteamos reproducir en la HL-Like1 mutaciones de la HL que no implicasen su centro activo.

En un reciente trabajo de nuestro grupo describíamos una nueva mutación de la HL que, sin afectar al centro activo de la enzima, producía la pérdida de actividad. Se trataba del cambio de la fenilalanina 192 por una

serina. Sorprendentemente, este aminoácido no se encontraba en el centro catalítico, sino que formaba parte de un cluster hidrofóbico, que incluía otros aminoácidos y cuya función parecía estar más relacionada con la estabilización del "core" de la enzima (Menao et al., 2009). Este aminoácido tenía además la característica de no estar siempre conservado así, mientras el chimpancé o el macaco poseían una fenilalanina, igual que los humanos, otras especies próximas como la rata o el ratón o alejadas como la *Pseudomonas mevalonii* tenían una leucina. Curiosamente, en la HL-Like1 el aminoácido homólogo a la fenilalanina 192 era también una leucina. Todo ello, nos llevó a plantear que lo importante no era el aminoácido en sí mismo sino su naturaleza apolar, que ayudaba a formar el supuesto cluster de estabilización del centro activo. Basándonos en esta idea mutamos la leucina 207 de la HL-Like1 por una serina. Este aminoácido en nuestro modelo se encuentra en la hélice $\alpha 7$ de la proteína, rodeado de una serie de aminoácidos hidrofóbicos (Val¹⁴¹, Gly¹⁴³, Met¹⁶², Phe¹⁶⁵, Gly¹⁸¹, Val¹⁸³, Val²⁰³, Ile²¹⁵) que bien podrían formar un cluster similar al descrito en la HL (Figura 4.8). La mutagénesis y posterior medida de actividad de la HL-Like1 mostró una pérdida completa de actividad. Estos datos indican que un aminoácido aparentemente periférico de la proteína, pero que nuestro modelo 3D le confiere importancia funcional, al ser mutado provoca la pérdida de actividad de la enzima. Todo ello no hace sino confirmar las bondades predictivas del modelo propuesto y lo refuerzan en su similitud con la realidad.

5.2. Identificación y caracterización de las variantes de *splicing* del gen *HMGCLL1*

El número de proteínas en humanos es mucho mayor que el número de genes, por ello se considera al mecanismo de *splicing* alternativo como uno de los mayores promotores de la expansión del complejo proteico. Aproximadamente, del 70 al 80% de los genes que codifican proteínas presentan algún tipo de *splicing* alternativo (Hertel, 2008; Johnson et al., 2003; Kampa et al., 2004). Las distintas proteínas codificadas a partir de un mismo mRNA pueden diferir en su actividad enzimática, su localización celular, su estabilidad, su plegamiento e incluso en sus modificaciones post-transcripcionales (Stamm et al., 2005).

Las primeras variantes de *splicing* identificadas del gen *HMGCLL1* fueron recogidas en la tesis de Sebastián Menao Guillén (2006), donde se comunicó la presencia de al menos dos transcritos alternativos. Sin embargo, el trabajo quedó inconcluso y por esta razón se convirtió en uno de los objetivos principales de la tesis. En su consecución se han utilizado dos estrategias diferentes pero complementarias. La primera se basó en la búsqueda en bases de datos, de cDNAs completos y ESTs, la segunda más experimental, consistió en la amplificación del cDNA del gen por fragmentos

solapantes.

Los experimentos realizados han mostrado datos sorprendentes. Lo primero que llama la atención es la gran cantidad de variantes encontradas, tanto de manera experimental como en las bases de datos. Se trata de un número muy superior a las descritas para el gen *HMGCL* (Muroi et al., 2000; Puisac et al., 2011). Sin embargo, y a pesar del gran número de variantes, ninguna incluye en su secuencia todos los exones del gen. Esto plantea un problema, ya que no parece existir un transcrito de referencia. Por ello, arbitrariamente se ha elegido a la más abundante, la denominada "variante b", como referencia. A partir de ella se ha clasificado al resto en dos grandes grupos: las que tienen inserción de exones y que incluye a las variantes "a y c", y las que tienen delección de exones y que engloba a todas las demás.

La "variante b" ha sido la primera en ser reportada en las bases de datos y es la que posee un mayor número de ESTs (55 de 77; el 71.4%). Su organización genómica, con 9 exones y 8 intrones, es la que más se parece a la del gen *HMGCL*, con un 67% de concordancia a nivel de mRNA (Tesis Sebastián Menao Guillén, 2006). Se trata de la única variante cuya existencia se ha demostrado a nivel de cDNA completo, y que tiene la capacidad de codificar una proteína funcional (HL-Like1) de 340 aminoácidos, con una homología del 83% con la HL (Tesis Sebastián Menao Guillén, 2006).

Las variantes "a y c" son más grandes que la "b", ya que en ellas se incluye un exón más, el exón 2 en la "variante a" y el exón 3 en la "variante c". Sin embargo, estos transcritos no son muy abundantes en las bases de datos y sólo se ha encontrado una única secuencia de ESTs para cada una de ellas. Por otro lado, no se ha podido demostrar de manera experimental su presencia a nivel de cDNA completo. Este hecho es sorprendente ya que las secuencias donadoras yceptoras de *splicing*, tanto del exón dos como del tres, están definidas como fuertes según los programas de grado de fortaleza. Sin embargo, su comportamiento experimental es el de exones muy débiles. Este hecho refuerza la idea de que existen otras variables a la hora de definir la fortaleza de un exón que parecen depender de la concentración de componentes del *spliceosoma* o de la presencia de activadores o represores del *splicing* (Hertel, 2008). Todos estos datos sugieren que la importancia de estas variantes, desde el punto de vista cuantitativo, parece ser mínima.

La "variante a", aunque no se ha podido clonar ni expresar, sí que parece capaz de producir una proteína activa. La secuencia proteica introducida por el exón dos pertenece al péptido líder de la HL-Like1, por lo que la proteína traducida podría tener un destino subcelular diferente al del resto de las variantes. Sin embargo, cuando se ha intentado amplificar el cDNA completo de este transcrito ha sido imposible conseguirlo. Esto puede deberse a la gran abundancia de la "variante b", que hace muy difícil una amplificación competitiva de ambos transcritos. Solamente cuando hemos empleado primers que hibridan de manera específica sobre el exón 2,

exclusivo de esta variante, se ha podido visualizarla en un gel de agarosa. Estos resultados sugieren que la importancia cuantitativa de la "variante a" debe ser mínima y en todo caso debe estar por debajo del 1% del total de transcritos del gen *HMGCLL1*.

En el caso de la "variante c", el exón tres incluye un codón de STOP en su secuencia, lo que provoca que sólo se traduzca una proteína de 53 aminoácidos. Esta proteína truncada es, muy probablemente, inactiva al carecer de todos los aminoácidos implicados en el centro catalítico. Además, al igual que ocurre con la "variante a", sólo se ha conseguido amplificar cuando se han empleado primers específicos, siendo imposible la obtención de su cDNA completo. La ausencia mayoritaria de esta variante podría explicarse por un mecanismo de "nonsense-mediated mRNA decay" (NMD), el cual se produce cuando aparecen codones de STOP prematuros en la secuencia del mRNA (Maquat, 2004).

En el caso de las variantes con delección, se han encontrado diferentes transcritos en los que faltan uno o varios exones. Se han localizado las variantes con delección de los exones 2 a 7, 2 a 9, 6, 6 y 7, y 6 a 9, tanto en las bases de datos como de manera experimental. Lo primero que destaca es que todos estos transcritos se originan a partir de los exones 2 ó 6, lo que sugiere que estos exones ponen en marcha un mecanismo de arrastre. El exón 2 pertenece exclusivamente a la "variante a" y su comportamiento experimental es el de un exón débil, por lo que la presencia de transcritos alternativos en los que está involucrado no debe sorprender. Por otra parte, el exón 6 está definido como débil por sus secuencias donadoras yceptoras de *splicing*, por lo que la presencia de transcritos alternativos en los que está implicado es esperable.

Además, también se ha encontrado otra variante más con la delección de los exones 3 a 7, no reportada en las bases de datos. Este transcrito alternativo se origina a partir de la "variante a" del gen y en él se pierde el marco de lectura, generándose una proteína truncada de tan sólo 76 aminoácidos. Al igual que ocurre con la "variante c", esta proteína carece de la mayoría de los aminoácidos que conforman el centro catalítico de la enzima y con toda seguridad es inactiva.

El hallazgo de todas estas variantes con delección de exones se puede relacionar con un mecanismo de arrastre, que ha sido propuesto en otros genes como el *HMGCL* (Casale et al., 1998; Puisac et al., 2011). Así, la mutación puntual c.G109T que provoca la pérdida del exón 2, ocasionalmente puede también arrastrar al exón 3 (Casale et al., 1998). Además, una de las variantes fisiológicas de *splicing* de este gen, la *HMGCLΔ5,6*, provoca la delección del exón 5 débil acompañada de la del exón 6 fuerte (Puisac et al., 2011). De todas maneras, aunque este fenómeno ha sido observado reiteradamente (Li et al., 2006; Rickers et al., 1994), el mecanismo de arrastre todavía no se comprende con exactitud.

Sin embargo, la principal pregunta que se nos plantea ante la presencia de tantos transcritos alternativos es si llegan a codificar proteínas funcionales. Nos planteamos el clonaje de todas estas variantes, pero debido a su elevado número, buscamos un elemento común a todas ellas. Al analizar las secuencias de cDNA de estos transcritos observamos que el exón 6 estaba ausente en todos ellos. Por esta razón, realizamos la delección del mismo y sobreexpresamos a la proteína delecionada, tanto en un modelo procarionota como eucariota. Aunque no fuimos capaces de sobreexpresar a la proteína mutada en el modelo bacteriano, sí que lo conseguimos en el modelo eucariota con resultados negativos respecto a su actividad enzimática. Estos datos indican que la proteína delecionada no es activa y, podemos asumir que el resto de las variantes de la HL-Like1 tampoco lo son. Estos resultados son similares a los obtenidos para las variantes fisiológicas de la HL, en las que se ha descrito que la pérdida de uno o varios exones conlleva la ausencia de actividad liasa de la enzima (Puisac et al., 2011).

En la delección del exón 6 se pierden los aminoácidos desde la Met¹⁰⁰ a la Ala¹³¹ y, aunque no se pierde ninguno de los aminoácidos catalíticos de la enzima (Tesis Sebastián Menao Guillén, 2006), la eliminación de la hélice $\alpha 3$ y de la lámina $\beta 3$, codificadas por los mismos, parece ser lo suficientemente grave como para que la enzima HL-Like1 carezca de toda actividad. La delección provoca la pérdida de un extremo de la estructura de TIM-barrel que posee la enzima HL-Like1, lo que muy posiblemente altera el plegamiento de la proteína. Además, la lámina $\beta 3$ forma parte de la pared del canal de entrada del sustrato, y su eliminación puede impedir el correcto acceso del HMG-CoA hasta el centro activo.

Finalmente, una vez demostrada la presencia de las diferentes variantes del gen *HMGCLL1* y que sus transcritos alternativos no producen proteínas activas, quisimos conocer si existía algún tipo de patrón de distribución por tejidos. Los datos obtenidos muestran que la "variante b" en su forma completa aparece en una mayor proporción en los tejidos fetales comparados con los adultos (Figura 4.14) pero, que el nivel de variantes delecionadas e inactivas es mayor en estos últimos. Todos estos resultados sugieren que se puede estar produciendo un mecanismo de bloqueo de la forma completa por parte de las variantes delecionadas en los tejidos adultos. Hasta ahora este mecanismo sólo se ha propuesto para los genes *HMGCL* y *HMGCS2* (Puisac et al., 2011), relacionando un mayor número de transcritos delecionados con tejidos no productores de cuerpos cetónicos. Sin embargo, para el gen *HMGCLL1* parece ser que este mecanismo de bloqueo potenciaría la enzima en determinadas etapas del desarrollo. Así, el mayor nivel de mRNA de la "variante b" en tejidos fetales y el aumento de las variantes inactivas en tejidos adultos, se podría relacionar con una mayor cantidad de enzima HL-Like1 en el feto.

5.3. Localización subcelular de la proteína HL-Like1

El desconocimiento de la localización subcelular de la proteína HL-Like1 era un escollo que se debía salvar para poder continuar profundizando en su función. Sin este dato, no se podía especular sobre su papel dentro de la célula, por lo que se planteó este estudio como un objetivo prioritario.

La técnica utilizada para conocer la localización subcelular de la HL-Like1 se basó en el empleo de proteínas fluorescentes. De esta manera fusionando la proteína problema con otra fluorescente y empleando un microscopio adecuado se pudo conocer la localización de la HL-Like1.

Las imágenes obtenidas con el microscopio confocal mostraron un patrón reticular (Figura 4.37A), que indicaba que la localización más probable de la nueva enzima era la del retículo endoplasmático. Estos datos se confirmaron al superponer su patrón de fluorescencia con el de la proteína calreticulina, específica de retículo endoplasmático (Figura 4.37C-C'). Estos mismos experimentos, pero utilizando un marcador mitocondrial (proteína HL) (Figura 4.38A-C) o peroxisomal (proteína PMP70) (Figura 4.39A-C), mostraron que la proteína HL-Like1 no presentaba el mismo patrón que las proteínas HL o PMP70, y confirmaba que no era una proteína ni mitocondrial ni peroxisomal.

La consecuencia de estos resultados es relevante. El que la HL-Like1 no colocalice con la HL indica, que nos encontramos ante una proteína que trabaja en un compartimento subcelular diferente a la HL. Por tanto, la función de la HL-Like1 dentro de la célula debe ser, necesariamente, distinta a la de la HL. El que tampoco se produzca colocalización en el peroxisoma también es destacable. Desde el año 1994 se conoce la existencia de una isoforma de la enzima HL de localización peroxisomal (Ashmarina et al., 1994). Las imágenes que hemos obtenido nos indican que la proteína HL-Like1 no es esa isoforma peroxisomal.

Una vez confirmada su localización en retículo endoplasmico, el siguiente paso fue conocer en qué lugar del mismo se encontraba, en la membrana o en el lumen reticular. Para ello, lo primero fue conocer las características de solubilidad de la proteína. Los experimentos mostraron que la HL-Like1 clonada era soluble, pero que en el entorno biológico, se encontraba asociada a las membranas del retículo. Una vez confirmada su naturaleza de proteína de membrana, el siguiente paso fue comprobar si se trataba de una proteína integral o periférica. Primero se confirmó que la proteína HL-Like1 no poseía en su secuencia dominios transmembrana y después, los experimentos de disociación mostraron que nos encontrábamos ante una proteína periférica de las membranas del retículo endoplasmático.

La siguiente cuestión a responder era, ¿hacia qué lado de la membrana

estaba orientada la HL-Like1? A pesar de que no se disponen de datos directos que ayuden a responder a esta pregunta, sí que existen datos indirectos que permiten sugerir una orientación de la HL-Like1 hacia la cara citosólica. Primero, el que se encuentre en la cara interna de las membranas de retículo es poco probable ya que el HMG-CoA, sustrato de la enzima, es incapaz de atravesar ningún tipo de membranas, por lo que se debería de producir en la luz del retículo. Sin embargo, no se ha descrito ninguna enzima HMG-CoA sintasa reticular que pueda sintetizar el HMG-CoA en el lumen del retículo endoplasmático. Por otra parte, en la realización de esta tesis se ha comprobado que la HL-Like1 es capaz de interaccionar con la tubulina, proteína de localización citosólica. Estos datos sugieren que es poco probable que la HL-Like1 mire hacia la luz del retículo endoplasmático, y que muy posiblemente se encuentre orientada hacia el citosol celular.

De confirmarse finalmente estos datos, se cerraría la ruta de síntesis de cuerpos cetónicos en el citosol celular, ya que todas las enzimas implicadas en esta ruta metabólica han sido ya descritas. Algunas de ellas también forman parte de la ruta de síntesis del colesterol, a partir de acetyl-CoA, como la acetoacetyl-CoA tiolasa o la HMG-CoA sintasa citosólica (Miziorko et al., 1990). En el año 2006, se identificó a una β -hidroxibutirato deshidrogenasa citosólica (Guo et al., 2006), quedando sólo una enzima con actividad liasa para completar esta ruta cetogénica. El hallazgo de la HL-Like1, con una localización en las membranas del retículo endoplasmático y, con una muy probable orientación citosólica, completaría esta ruta metabólica.

Todos estos resultados abren una nueva e interesante perspectiva sobre el uso del HMG-CoA citosólico, ya que ahora podría derivarse hacia dos rutas metabólicas diferentes: la síntesis de colesterol o la síntesis de cuerpos cetónicos. Así, la HL-Like1 y la HMG-CoA reductasa (HMGR) (Liscum et al., 1985) comparten el sustrato, la localización subcelular en retículo y, muy probablemente, la orientación de sus centros activos hacia el citosol celular. Como es bien conocido, la HMGR es una enzima implicada en la síntesis de colesterol y principal punto de regulación de la ruta (Jo y Debose-Boyd, 2010). De esta manera, se podría plantear la posibilidad de que la HL-Like1 compitiese por el sustrato con la HMG-CoA reductasa. Esta idea también fue propuesta para la isoforma peroxisomal de la HL (Ashmarina et al., 1994).

5.4. Estudio diferencial de las proteínas HL-Like1 y HL por tejidos

Tras demostrar la gran similitud estructural de las proteínas HL-Like1 y HL, y su diferente localización subcelular, el siguiente objetivo que nos planteamos fue comprobar si existía un patrón característico de expresión de

estas enzimas en diferentes tejidos humanos y en distintas etapas del desarrollo.

5.4.1. CARACTERÍSTICAS CINÉTICAS DE LAS PROTEÍNAS HL-LIKE1 Y HL

Desde el año 1988, existe un método fácil y rápido para la realización de medidas de actividad de la enzima HL (Wanders et al., 1988). Por esta razón, y a pesar de que ya se había realizado una primera aproximación a las características cinéticas de las enzimas HL y HL-Like1, unidas a la proteína MBP (Tesis Sebastián Menao Guillén, 2006; Menao et al., 2009), se planteó en esta tesis un estudio más completo.

El primer dato a destacar es que en nuestro estudio la velocidad máxima de ambas enzimas se encontró a pH 8, un valor más bajo que el pH 9 al que Wanders reportó la máxima actividad para la HL (Wanders et al., 1988). Esto quizás se podría explicar por la distinta naturaleza de las muestras de partida, fibroblastos en el caso de Wanders y la proteína unida a MBP en el nuestro.

Los datos cinéticos obtenidos de V_{max} y K_m nos muestran que la HL-Like1 es una enzima que trabaja a una velocidad menor que la HL (25 nmol/min*mg proteína HL-Like1 y 145 nmol/min*mg proteína HL) a pH 8, y que necesita menor cantidad de sustrato para alcanzar la mitad de su actividad máxima (K_m 75 μ M HL-Like1 y 140 μ M HL). Aunque la velocidad de trabajo de la HL-Like1 es notablemente inferior a la de la HL, al tener un K_m más bajo necesita una cantidad menor de sustrato para comenzar a trabajar. Estos datos cinéticos sugieren que la HL-Like1 trabaja en un compartimento subcelular donde la disponibilidad del sustrato HMG-CoA quizás sea menor y refuerzan la idea de que nos encontramos ante una isoenzima de la HL con unas características cinéticas diferentes (Tesis Sebastián Menao Guillén, 2006).

Respecto a la HL tanto los datos de su K_m como de V_{max} varían entre los diferentes pHs. A pH 9 su V_{max} es menor (50 nmol/min*mg), sin embargo su afinidad es mayor, al tener un valor de K_m de tan sólo 25 μ M. Por el contrario, a pH 8 su V_{max} es más elevada (145 nmol/min*mg), pero necesita una mayor cantidad de sustrato para alcanzarla, al poseer un valor de K_m de 140 μ M. El dato de K_m a pH 9 es prácticamente el mismo que reportó el grupo de Dr. H.M. Miziorko (24 μ M) aunque ellos utilizaron un vector de expresión para la proteína HL diferente, el plásmido pTrc99A (Roberts et al., 1994). Sin embargo, se ha reportado una gran amplitud de valores de V_{max} para la HL, desde 22 nmol/min*mg por el grupo del Dr. R.J.A. Wanders (Wanders et al., 1988), hasta 159 nmol/min*mg por el grupo del Dr. H.M. Miziorko (Roberts et al., 1994). Nuestros resultados concuerdan con algunos de los reportados en la bibliografía (Roberts et al., 1994), con la ventaja añadida de que el método de expresión y purificación de la proteína

HL es más rápido y eficaz (Menao et al., 2009).

Al comparar los datos cinéticos de la HL-Like1 clonada con los obtenidos de la actividad liasa de la fracción citosol + retículo del testículo humano se observa que, aunque existen discrepancias en cuanto al comportamiento de la V_{max} y la K_m a diferentes pHs, la relación $\Delta V_{max}/K_m$ es parecida (0.96 para fracción citosol + retículo; 1.1 para HL-Like1). Este comportamiento también se repite entre la fracción mitocondrial (0.41) y la HL (0.515). Estos resultados corroboran, de manera indirecta, la diferente localización subcelular de ambas enzimas y coinciden con los datos obtenidos en los experimentos de colocalización en cultivos celulares.

Sin embargo, todas estas medidas de actividad se han realizado sobre proteínas clonadas a las cuales les falta el péptido líder. Aunque se conoce, sobre todo en el caso de la HL, que el péptido líder no influye en las medidas de actividad (Ashmarina et al., 1996), este hecho no se puede afirmar por completo para la enzima HL-Like1. Por esta razón hemos realizado medidas de actividad liasa sobre cultivos en los cuales hemos sobreexpresado previamente a las proteínas HL-Like1 y HL clonadas completas. Los resultados mostraron un aumento en la actividad liasa total de los cultivos. El aumento de actividad fue del 46% para la enzima HL-Like1 y del 84% para la HL. Estos datos confirmaron que la proteína HL-Like1 completa es activa en un modelo eucariota.

Estos datos cinéticos pueden proporcionar pistas sobre la función de la HL-Like1 dentro de la célula. Atendiendo a su localización en las membranas del retículo endoplasmático y a que posee actividad liasa, la primera cuestión que se plantea es, ¿pueden la HMGCR y la HL-Like1 competir por el HMG-CoA? Respecto a la enzima HMGCR se han realizado multitud de estudios enzimáticos que han proporcionado datos relativos a sus valores de K_m y V_{max} en diferentes tejidos. En tejido hepático adulto se ha calculado una K_m de 1 μM (Langdon y Counsell, 1976) y una V_{max} que varía entre 60.5 y 78 $\text{pmol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ (Honda et al., 2000; Nicolau et al., 1974). Sin embargo, los resultados en hígado fetal son mucho más elevados, siendo la V_{max} 428 $\text{pmol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ (Carr et al., 1985). Estos datos sugieren que la competencia entre la HMGCR y la HL-Like1 en tejido hepático parece poco probable en cualquier etapa del desarrollo, al tener la HMGCR mayor afinidad por el sustrato y una V_{max} muy superior a la calculada para la HL-Like1.

Sin embargo, el valor de V_{max} de la HMGCR varía mucho entre diferentes tejidos. Por ejemplo, en leucocitos se le ha calculado un valor de tan sólo 9.6 $\text{pmol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ (Harwood et al., 1984) y en fibroblastos la V_{max} es de 15.6 $\text{pmol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ (Brown et al., 1973). Estos datos permiten sugerir que una competencia entre las enzimas HL-Like1 y HMGCR, en tejidos distintos del hígado, no debe ser descartada.

5.4.2. DESARROLLO DE UN ANTICUERPO ESPECÍFICO CONTRA LA HL-LIKE1

El uso de anticuerpos es una herramienta muy útil para el desarrollo de diferentes técnicas de biología molecular. A lo largo de los años se ha ido perfeccionando su obtención, pureza y la especificidad de los mismos, hasta llegar a reconocer únicamente a una determinada secuencia (Altshuler et al., 2010).

En el caso de la proteína HL-Like1 no existía ningún anticuerpo comercial, que fuese capaz de reconocerla de manera específica. Los estudios preliminares se habían realizado utilizando anticuerpos policlonales que iban dirigidos contra la HL, pero que eran capaces de reconocer a la proteína HL-Like1 (Tesis Sebastián Menao Guillén, 2006). Se trataba de anticuerpos obtenidos de manera tradicional, mediante la inoculación de la proteína HL entera en conejos, y que habían sido suministrados por el laboratorio del Prof. F.G. Hegardt.

En el momento de realizar esta tesis ya se habían comercializado diferentes anticuerpos capaces de reconocer a la HL, y uno de ellos fue empleado en el desarrollo de la misma (Abnova Cat. nº. H00003155-M01). Sin embargo, este anticuerpo era incapaz de reconocer a la proteína HL-Like1. Por todas estas razones se planteó el desarrollo de un anticuerpo específico contra la proteína HL-Like1 con el fin de poder distinguir entre ambas isoenzimas.

El primer paso fue elegir la secuencia inmunogénica. Para ello debíamos tener en cuenta la gran homología existente entre las proteínas HL-Like1 y HL, de más del 80% (Tesis Sebastián Menao Guillén, 2006) y buscar aquellas zonas donde ésta fuese menor. Aunque la secuencia correspondiente al péptido líder era la que menos homología poseía, al ser una secuencia susceptible de ser eliminada durante el procesamiento de la HL-Like1, no parecía la más indicada para ser reconocida por el anticuerpo. Por esta razón, buscamos otras zonas de la proteína donde la homología también fuese menor. Se localizaron dos secuencias susceptibles de ser empleadas como epítipo, la primera estaba comprendida entre los aminoácidos Gly¹⁰⁹ y Tyr¹¹⁹, y la segunda entre la Ser¹⁶⁷ y el Asn¹⁷⁶. Finalmente, elegimos la segunda al ser más inmunogénica. Los aminoácidos codificados en este segmento eran los que formaban la hélice α_6 de la HL-Like1.

Una vez obtenido el anticuerpo por parte de la casa comercial Abyntek Biopharma S.L, se probó su eficacia y especificidad sobre las proteínas HL-Like1 y HL clonadas. Los resultados indicaron que el nuevo anticuerpo era capaz de reconocer de manera específica a la HL-Like1 clonada, pero no a la HL (Figura 4.58). Estos datos positivos nos animaron a realizar otras comprobaciones sobre cultivos celulares, para visualizar a la proteína endógena. Los resultados de inmunofluorescencia mostraron un marcaje con

un patrón reticular (Figura 4.61), que se podía interpretar como perteneciente a la proteína HL-Like1, de la que ya habíamos demostrado su localización en retículo endoplasmático.

Todos estos resultados confirmaban que habíamos obtenido un anticuerpo específico contra la HL-Like1, que además, era incapaz de reconocer a la proteína HL, ni clonada ni sobreexpresada.

5.4.3. COMPARACIÓN POR TEJIDOS DE LA ACTIVIDAD Y NIVEL DE EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS HL-LIKE1 Y HL

Aunque la HL es una enzima que ha sido ampliamente estudiada en las últimas décadas, los datos de expresión por tejidos son muy limitados y en la mayoría de las ocasiones se han realizado en modelos animales no siempre extrapolables al género humano. Así, por ejemplo, aunque hay mucha información sobre el papel de la enzima en el tejido hepático, no existen datos que expliquen su función en tejidos considerados cetogénicos como el riñón y el intestino (Nakatani et al., 1996; Thumelin et al., 1993). Por esta razón, en este trabajo, nos planteamos realizar simultáneamente el estudio tisular de la HL y de la HL-Like1. El primero, además nos sirvió para comprender mejor algunas de las complicaciones que sufren los pacientes con aciduria 3-hidroxi-3-metilglutárica, y también como punto de comparación para los datos obtenidos con la enzima HL-Like1.

Como material de partida se tomaron tejidos humanos obtenidos de autopsias. Aunque los cadáveres se mantuvieron a 4 °C y los tejidos fueron inmediatamente congelados en nitrógeno líquido, hay que tomar con cautela los resultados de estos experimentos. Por ley deben transcurrir 24 horas desde el fallecimiento a la realización de la autopsia y, durante este tiempo los tejidos empiezan a degradarse, haciéndolo además a distinta velocidad según el tipo de tejido. A pesar de estas limitaciones, los estudios sobre muestras humanas son fundamentales y aportan datos y matices muy interesantes que se pierden en el estudio de animales. Además, en algunas ocasiones el comportamiento de las enzimas o la regulación de las vías metabólicas difieren entre los modelos animales y los humanos.

El papel de los cuerpos cetónicos en tejidos adultos ha sido ampliamente estudiado, desempeñando funciones generales, como las de servir de fuente de energía alternativa (Edmond et al., 1992; Zammit, 1981), o más específicas como las de neuroprotección (Guzmán y Blázquez, 2004; Maalouf et al., 2007, 2009). Sin embargo, se conoce menos sobre su función en los tejidos fetales. Se sabe, que los cuerpos cetónicos en esta fase del desarrollo proceden principalmente de la madre, y que son capaces de atravesar la placenta (Herrera, 2000). Una vez en el feto, su principal función parece ser que es la de servir de fuente de energía o sustrato lipogénico (Arahetes et al., 1986; Herrera y Amusquivar, 2000; Lust et al., 2003).

Teniendo en cuenta la falta de datos de la proteína HL en tejidos fetales humanos, lo primero que se hizo fue estudiar su patrón de expresión en esta fase del desarrollo. Los resultados de western-blot obtenidos muestran que sólo hay proteína HL en pulmón y riñón fetal y coinciden con los que se obtuvieron en la Real-Time PCR, que mostraban también niveles más altos de mRNA en estos tejidos (Tesis Sebastián Meano Guillén, 2006). Sin embargo, parece que la proteína HL tiene un comportamiento muy diferente al de los tejidos adultos. Así, la enzima en hígado fetal no parece tener relevancia al carecer de niveles significativos de expresión. Ésta podría ser la razón, por la cual los pacientes con aciduria 3-hidroxi-3-metilglutárica no manifiestan clínica intrauterina. En este período los cuerpos cetónicos se producirían en el hígado materno y, desde allí serían enviados al feto para su uso (Herrera, 2000).

En el caso de pulmón fetal, los cuerpos cetónicos sirven como sustrato lipogénico para formar el surfactante en los pneumocitos tipo II (Fox et al., 1996) y podrían ser en parte producidos *in situ* por la HL pulmonar fetal. Sin embargo, los pacientes con déficit de HL no manifiestan ninguna patología pulmonar al nacer, lo que sugiere que la mayor parte de estos cuerpos cetónicos tienen un origen materno (Herrera, 2000). Para el riñón fetal, resulta más difícil elaborar una hipótesis sobre la función específica de la HL y serán necesarios nuevos estudios para poder conocer su papel en este tejido.

Todos estos experimentos, relativos al nivel de proteína HL en tejidos fetales, son los primeros que se han realizado. Aunque son muy preliminares, ya indican que existen diferencias en el comportamiento por tejidos de la enzima según las fases del desarrollo. Parece ser que la HL tiene una mayor importancia durante el periodo extrauterino, tal vez, porque la ausencia de cuerpos cetónicos puede ser compensada por los que la madre aporta (Herrera, 2000). Sin embargo, esto no ocurre en algunos modelos animales como el ratón. En el año 1998, el grupo del Dr. G.A. Mitchell desarrolló un ratón *knock-out* para el gen *HMGCL* (Wang et al., 1998), que fallecía en la fase embrionaria. Sin embargo, no se ha reportado ningún caso de muerte en fase ni embrionaria ni fetal de pacientes con déficit de HL, teniendo estos un desarrollo intrauterino normal. Estos resultados son otra prueba de las diferencias existentes entre las distintas especies, y avalan los experimentos realizados sobre muestras de tejido humano.

Una vez conocidos los datos de expresión de la HL en tejidos humanos fetales, quisimos compararlos con los resultados de expresión de la proteína HL-Like1. Los datos de Real-Time PCR ya indicaban diferencias en cuanto al nivel de mRNA entre ambas enzimas (Tesis Sebastián Meano Guillén, 2006), y mostraban al cerebro fetal como el tejido con un mayor nivel de expresión de mRNA para el gen *HMGCLL1*. Los experimentos de western-blot realizados en diferentes tejidos fetales confirmaron estos datos y mostraron al cerebro como el único tejido con un nivel de expresión de la proteína HL-Like1

apreciable. Sin embargo, el resto de tejidos analizados (pulmón, riñón, hígado, corazón, músculo y páncreas) no poseían un nivel significativo de proteína. Por otra parte, resultó imposible medir actividad liasa en las distintas fracciones subcelulares de estos tejidos, debido a la poca cantidad de muestra de partida y a la dificultad en su obtención.

Todos estos resultados inducen a pensar que la HL-Like1 debe tener un papel principal en cerebro fetal. Es el único tejido donde se ha demostrado su presencia a nivel de la proteína y posee un mayor nivel de mensajeros (Tesis Sebastián Menao Guillén, 2006). Además, es en él, donde se ha encontrado el mayor nivel de la "variante b" de referencia y el menor nivel de las variantes deletadas, lo que podría estar potenciando la transcripción y traducción de la forma funcionalmente activa del gen *HMGCLL1*. Sin embargo, son pocos los datos que se disponen para lanzar hipótesis concretas respecto al papel de los cuerpos cetónicos en el cerebro fetal humano. Se han reportado diferentes funciones para los mismos en el cerebro adulto, algunas de las cuales, como la neuroprotección o la síntesis de lípidos, podrían también desempeñarse en el cerebro fetal. La HL-Like1 podría estar implicada en alguno de estos papeles, aunque serán necesarios nuevos estudios para confirmarlo.

Aunque una posible competencia con la enzima HMG-CoA reductasa es una idea muy atractiva, la elevada cantidad de mRNA de esta proteína (Hanaka et al., 2000), así como la gran síntesis de colesterol (Nieweg et al., 2009) en las células de la glía de ratas recién nacidas, hace poco probable que se dé. La mayor parte del colesterol es sintetizado por las células del cerebro (Haave e Innis, 2001), siendo la HMGCR una enzima muy activa (Langan et al., 1987). La HL-Like1 podría estar regulando la producción de lípidos en el cerebro fetal, ejerciendo una especie de freno sobre la HMGCR, que evitase la excesiva acumulación de colesterol. A pesar de que esta idea es muy sugerente, es poco probable que tenga lugar en vista de las características cinéticas de ambas enzimas.

El siguiente paso fue realizar estos mismos experimentos en tejidos humanos adultos. En este caso, y debido a la mayor cantidad de muestra de partida, además de los experimentos de western-blot, también se pudieron realizar medidas de actividad liasa en distintas fracciones subcelulares.

Los primeros datos a destacar son que, al contrario de lo que ocurre en los tejidos fetales, tanto la HL como la HL-Like1 se expresan en un mayor número de tejidos adultos. El hígado destaca sobre el resto de tejidos en cuanto al nivel de expresión de la proteína HL, como era de esperar. Sin embargo otros tejidos como el páncreas también poseen un elevado nivel de expresión de la HL. En el caso de la HL-Like1 no parece existir un tejido con un nivel de proteína sobresaliente sobre el resto, aunque éste es algo más elevado en pulmón, riñón, corazón y cerebro.

Sin embargo, en relación al nivel de actividad de las distintas

fracciones subcelulares por tejidos sí que existen diferencias importantes entre ambas enzimas. En el caso de la HL, la mayor parte de las medidas de actividad liasa en tejidos se han hecho sobre fibroblastos (Wanders et al., 1988) o linfocitos (Ozand et al., 1991) de pacientes con aciduria 3-hidroxi-3-metilglutárica. Hasta ahora no se han realizado estudios de actividad liasa por tejidos, a pesar de que se ha descrito al riñón y al intestino como tejidos cetogénicos (Nakatani et al., 1996; Thumelin et al., 1993). Los resultados obtenidos vuelven a mostrar al hígado como el tejido a destacar sobre todos los demás, con un nivel de actividad liasa muy superior al resto. Los datos obtenidos en páncreas son sorprendentes ya que revelan que posee una elevada capacidad cetogénica, hasta ahora desconocida. Por otra parte, no existe ningún tejido que sobresalga sobre el resto respecto a la actividad de la HL-Like1, obteniéndose niveles muy bajos al compararlos con los obtenidos en la fracción mitocondrial. Este hecho se podría deber al mecanismo de bloqueo propuesto para los transcritos con delección del gen *HMGCLL1*, que son mucho más abundantes en tejidos adultos humanos.

El primer resultado a destacar es la presencia de proteína y actividad liasa perteneciente a la enzima HL-Like1 en cerebro adulto. Sin embargo, no hay actividad liasa ni expresión proteica de la HL en este tejido (Puisac et al., 2010). Siempre ha existido una gran controversia entre si existía o no actividad liasa extra-mitocondrial. Aunque experimentos previos realizados en rata (Shah, 1982) o pollo (Clinkenbeard et al., 1975) medían actividad en el citosol de cerebro, ésta se atribuía a la rotura de mitocondrias durante el proceso de fraccionamiento subcelular (Clinkenbeard et al., 1975). Sin embargo, los datos que aquí se recogen indican que sí existe actividad liasa fuera de las mitocondrias en cerebro, pero que no procede de la ruptura de las mismas, y por lo tanto de la HL, sino de la nueva enzima HL-Like1.

Este hallazgo es muy relevante y abre nuevas perspectivas sobre el papel que los cuerpos cetónicos pueden desempeñar en este tejido. Muchos estudios han reportado la importancia de los cuerpos cetónicos como agentes neuroprotectores (Guzmán y Blázquez, 2004; Maalouf et al., 2007, 2009), en patologías neurodegenerativas como el Alzheimer (Kashiwaya et al., 2000) o como precursores lipídicos de la colesterologénesis (Lopes-Cardozo et al., 1984). Además, el cerebro es capaz de cambiar su metabolito energético principal, la glucosa, por los cuerpos cetónicos en determinadas situaciones metabólicas (Morris, 2005). Estos datos permiten lanzar hipótesis que relacionen a la HL-Like1 con un papel en la neuroprotección. Los hallazgos del grupo del Dr. M. Moriyama proponen un mecanismo de inhibición de la salida de glutamato, en el cual estaría íntimamente implicado el acetoacetato (Juge et al., 2010). Los cuerpos cetónicos producidos por la HL-Like1 podrían estar desempeñando este papel neuroprotector al ser producidos *in situ* en el cerebro.

Sin embargo, tampoco podemos descartar la función de obtención de un sustrato energético alternativo a la glucosa para la HL-Like1, en vista de

la ausencia de la proteína HL y de actividad liasa mitocondrial en cerebro adulto (Puisac et al., 2010), aunque este papel parece poco probable. De ser así, la HL-Like1 podría suplir la ausencia de la HL en los pacientes con aciduria 3-hidroxi-3-metilglutárica, hecho que no se produce. Los requerimientos energéticos del cerebro son muy elevados y la poca actividad de la HL-Like1 parece que sería insuficiente para cubrirlos en su totalidad.

Otra opción aunque muy especulativa podría relacionar la acción de la HL-Like1 con el control de la ingesta. Se ha estudiado el posible papel del β -hidroxibutirato en este proceso en las últimas décadas, con resultados no muy concluyentes (Arase et al., 1988; Fisler et al., 1984). Sin embargo, recientes experimentos inyectando cuerpos cetónicos en el rombencéfalo de ratas diabéticas les ha provocado una hiperglicemia y una movilización de ácidos grasos. Por otro lado, cuando se ha inhibido la captación de cuerpos cetónicos por el cerebro, los niveles de ingesta de estos animales se han normalizado (Iwata et al., 2011). Estos resultados sugieren que la hiperfagia en animales diabéticos estaría marcada por un sensor de cuerpos cetónicos en el rombencéfalo. Todo ello, permite hipotetizar con un posible papel de la HL-Like1 en el control de la ingesta, al ser capaz de producir cuerpos cetónicos *in situ*.

Otro tejido en el que se ha reportado un papel de los cuerpos cetónicos, adicional al de sustrato energético alternativo a la glucosa, es el páncreas. En este tejido se ha demostrado la existencia de las proteínas HL y HL-Like1, así como actividad liasa procedente de ambas. Sin embargo, tanto el nivel de expresión como de actividad de la HL-Like1 es muy inferior al encontrado para la HL (Puisac et al., 2010), por lo que no parece probable que tenga una función específica en este tejido. Esto no ocurre con la HL, cuyos valores de expresión y actividad son relativamente elevados (Puisac et al., 2010).

Los resultados obtenidos indican que el páncreas tiene una elevada capacidad cetogénica y sugieren que, si los cuerpos cetónicos regulan la secreción de insulina (Biden y Taylor 1983; Malaisse et al., 1990; Rhodes et al., 1985), algunos de ellos podrían ser producidos *in situ* en el páncreas por la enzima HL (Puisac et al., 2010). La relación establecida entre la salida de aciles de cadena corta, principalmente en forma de acetoacetato y citrato, desde la mitocondria al citosol (MacDonald et al., 2007), con un aumento en la secreción de insulina, y la existencia de un elevado nivel de actividad liasa procedente de la proteína HL (Puisac et al., 2010), permite sugerir que esta enzima podría estar implicada en la salida de la insulina de las células pancreáticas.

El hallazgo de una elevada actividad HL en páncreas ayuda a comprender las bases funcionales de la pancreatitis asociada a la aciduria 3-hidroxi-3-metilglutárica. La pancreatitis es una complicación potencial en pacientes con acidurias orgánicas, especialmente la metilmalónica y la isovalérica (Kahler et al., 1994), pero es menos frecuente en la 3-hidroxi-3-

metilglutárica (Muroi et al., 2000; Wilson et al., 1984). La actividad liasa elevada en el páncreas indica que este órgano puede ser más susceptible a la acumulación de metabolitos tóxicos. Esta hipótesis ha sido propuesta para explicar la patogénesis de otras acidurias orgánicas del catabolismo de la leucina (Gut et al., 1995; Kahler et al., 1994).

Otro tejido con un papel muy importante relativo al metabolismo de los cuerpos cetónicos es el hígado, de ahí que su estudio fuese imprescindible en este trabajo. Se trata del tejido cetogénico por excelencia, fuente de los cuerpos cetónicos en situaciones de ayuno, ejercicio intenso o diabetes (Balasse, 1979; Barrera et al., 2009; Herrera, 2002). Desde aquí los cuerpos cetónicos son exportados al resto de tejidos para su uso, por lo que los elevados valores de expresión y de actividad HL no son sorprendentes (Puisac et al., 2010). Por otra parte, los datos obtenidos de actividad y de expresión de la HL-Like1 son bajos, lo que sugiere que esta enzima, muy posiblemente, no tenga una especial relevancia en este tejido.

Para el resto de tejidos analizados en este estudio como el riñón, pulmón, testículo, o músculo esquelético no se han descrito patologías específicas en pacientes con déficit de HL, ni ningún papel concreto para los cuerpos cetónicos que pudiese ser desempeñado por la HL-Like1.

Finalmente, y como resumen de todos los resultados obtenidos, debemos destacar la diferente distribución por tejidos, tanto fetales como adultos, de las proteínas HL y HL-Like1. La HL sólo se expresa en pulmón y riñón fetal y, sorprendentemente, no lo hace en hígado. Sin embargo, los experimentos realizados en tejidos adultos muestran al hígado, seguido por el páncreas, como los tejidos con un mayor nivel de expresión y de actividad HL. Estas diferencias entre los tejidos fetales y adultos indican que el papel de la enzima varía en las distintas etapas del desarrollo. Por otra parte, los datos obtenidos para la HL-Like1 sugieren que tiene un papel importante en cerebro fetal, al ser el único tejido fetal donde se expresa. Sin embargo, se ha encontrado proteína en diferentes tejidos adultos aunque con un nivel de actividad bajo. Estos datos sugieren que la función de la HL-Like1 podría ser más específica en cerebro fetal que en el resto de tejidos analizados.

5.5. Estudio de la interacción de la proteína HL-Like1 con la tubulina.

La tubulina es una proteína globular que forma parte de los microtúbulos del citoesqueleto celular. En los últimos años se ha descrito la importancia que su forma acetilada tiene en las funciones celulares (Perdiz et al., 2011). Por ejemplo, es capaz de controlar las vías de señalización, mediante la regulación e interacción con proteínas de la membrana plasmática (Arce et al., 2008).

El estudio de la interacción entre las proteínas HL-Like1 y tubulina se planteó como un estudio paralelo al principal de esta tesis. Los datos bibliográficos establecían una relación indirecta entre la tubulina acetilada y la ruta cetogénica a través de histonas deacetilasas (HDAC) (Camarero et al., 2003; Matsuyama et al., 2002). Así, se relacionaba un aumento de la actividad HDAC1 con la hipoacetilación del promotor de la enzima mHS, lo que provocaba una disminución de su transcripción y actividad (Camarero et al., 2003). Por otro lado, las HDACs también tienen como sustrato a la tubulina, provocando la deacetilación de la misma (Matsuyama et al., 2002). Además, también se ha reportado que la acetilación estabiliza al factor de transcripción SREBP (Giandomenico et al., 2003), el cual regula la transcripción de genes implicados en el metabolismo del colesterol como la HMG-CoA sintasa citosólica o la HMG-CoA reductasa. Últimamente, se ha relacionado de manera indirecta a la acetilación de la tubulina con un descenso de la actividad HMGCR, a través de las $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ (Arce et al., 2008; Dhanya et al., 2003). Con estos datos previos, algunos de ellos aparentemente contradictorios, quisimos conocer si existía una relación entre la tubulina acetilada y la enzima HL-Like1, en vista de que el nivel de acetilación celular y el de tubulina podían influir sobre las rutas cetogénica y colesterogénica.

El primer paso fue confirmar si existía interacción real entre las HMG-CoA liasas y la tubulina, ya que se sabía que la tubulina era capaz de interactuar directamente con otras proteínas (Perdiz et al., 2011). Para confirmar esta asociación se realizaron experimentos de co-inmunoprecipitación, que mostraron la interacción entre la HL-Like1 y la HL con la tubulina. Teniendo en cuenta la localización mitocondrial de la HL parece poco probable que la tubulina y la HL interactúen *in vivo*, por lo que esta asociación podría estar produciéndose por el origen evolutivo común con la HL-Like1 (Strachan, 1992). Posiblemente la HMG-CoA liasa primigenia tenía capacidad para interactuar con la tubulina y esta característica se ha conservado a lo largo de la evolución en sus enzimas hijas.

Una vez confirmada esta asociación el siguiente paso fue comprobar si esta unión modulaba la actividad de la HL-Like1. Los experimentos de actividad mostraron que, cuando se añadían cantidades crecientes de tubulina a la mezcla de reacción, la actividad de la HL-Like1 aumentaba. Estos resultados sugerían que la tubulina era capaz de activar a la HL-Like1 *in vitro*. Los experimentos con la proteína HL fueron similares, pero su actividad se vio incrementada en menor proporción.

El hallazgo de que la tubulina acetilada es capaz de activar a la enzima HL-Like1 es muy interesante. De manera indirecta se ha relacionado un aumento de la acetilación de la tubulina con una disminución de la actividad de la HMG-CoA reductasa, a través de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ (Arce et al., 2008; Dhanya et al., 2003). Teniendo en cuenta que las enzimas HL-Like1 y HMGCR comparten la localización y el sustrato, el que una de ellas sea

directamente activada por la tubulina acetilada mientras que la otra pueda ser inhibida es muy relevante. Estos resultados sugieren que es posible que en determinadas situaciones fisiológicas, en las que el nivel de tubulina acetilada sea mayor, el aumento de la actividad de la HL-Like1 junto con la inhibición de la HMGCR, haga posible que el sustrato HMG-CoA se derive hacia la vía cetogénica.

Una vez confirmada la interacción entre la tubulina y la HL-Like1 y el efecto que esta unión tenía, el siguiente paso fue conocer por dónde se producía dicha asociación. Los datos bioinformáticos indicaban que la hélice $\alpha 12$ de la HL-Like1 era el lugar más probable, por esta razón, se realizaron deleciones seriadas de los aminoácidos que formaban esta estructura. De esta manera, se quería confirmar si la interacción se producía por esta zona, y si se ocasionaban cambios en la regulación de la actividad por tubulina.

Los resultados negativos en cuanto a la obtención de la proteína HL-Like1 sin su hélice $\alpha 12$ hicieron imposible este estudio. Realizamos diferentes deleciones de 3, 6 y 9 aminoácidos del extremo C-terminal, pero ninguna de ellas produjo una proteína soluble en modelos procariontes. Sin embargo, sí que pudimos obtener la proteína HL sin su hélice $\alpha 12$. Los resultados obtenidos corroboraban lo reportado por el grupo de la Dra. N. Casals. La eliminación de hasta 12 aminoácidos del extremo C-terminal de la HL no provocaba la pérdida de actividad de la enzima (Carrasco et al., 2007). Sin embargo, cuando repetíamos los experimentos con la HL sin su hélice $\alpha 12$ y en presencia de tubulina, no se producía un aumento de actividad de la enzima. Esta falta de modulación de la tubulina sugería que la interacción entre ambas proteínas se había perdido y que la hélice $\alpha 12$ era la responsable de ello. Si todo ello fuera extrapolable a la HL-Like1 y nosotros creemos que sí, se podría aventurar que la tubulina y la HL-Like1 también interaccionan a través de la hélice $\alpha 12$. Sin embargo, nuevos experimentos deberán ser puestos a punto para probar esta afirmación.

La confirmación de la interacción entre las proteínas HL-Like1 y tubulina, así como la influencia sobre la actividad enzimática de la primera abre nuevas perspectivas al papel que puede tener la enzima HL-Like1 en el organismo. Se conoce que la acetilación de los microtúbulos es importante en las primeras etapas del desarrollo, en la migración y en la diferenciación de las neuronas (Janke y Kneussel, 2010). Teniendo en cuenta la mayor presencia de la proteína HL-Like1 en cerebro fetal, y que el nivel de acetilación de la tubulina en este tejido en las primeras etapas de la vida es muy importante, es posible que la interacción entre ambas proteínas se produzca en el cerebro fetal. De confirmarse esta asociación *in vivo*, la actividad de la HL-Like1 aumentaría de valor y podría competir con la HMG-CoA Reductasa. Este hallazgo abre nuevas perspectivas al papel que los cuerpos cetónicos puedan ejercer en el cerebro fetal.

CONCLUSIONES

1. Se refuerza la validez del modelo estructural propuesto para la HL-Like1, mediante el estudio comparativo del efecto que las mutaciones homólogas del gen *HMGCL* tienen sobre la proteína HL-Like1
2. El gen *HMGCLL1* posee un elevado número de variantes fisiológicas de *splicing*, entre las que destaca por su importancia funcional y cuantitativa la denominada "variante b o variante de referencia" que carece de los exones 2 y 3.
3. Se han encontrado 7 variantes de *splicing* fisiológico del gen *HMGCLL1*: 5 con delección de exones (2 a 7, 2 a 9, 6, 6 y 7, 6 a 9) que generan proteínas inactivas y 2 con inserción de exones (variantes a y c), de muy escasa importancia cuantitativa y funcional.
4. El nivel de variantes de *splicing* fisiológico inactivas en los tejidos adultos es claramente superior a la de los tejidos fetales. Ello sugiere la existencia de un posible mecanismo de bloqueo de las variantes delecionadas sobre la variante de referencia del gen *HMGCLL1* en los tejidos adultos.
5. La proteína HL-Like1 está localizada en el retículo endoplasmático según muestran los experimentos de

colocalización. Además, los experimentos de asociación -disociación indican que esta enzima es una proteína periférica de la membrana del retículo endoplásmico.

- 6. Las características cinéticas (V_{max} y K_m) de la HL-Like1 muestran que posee una mayor afinidad por el sustrato y una menor velocidad que la HL mitocondrial.**
- 7. Las características cinéticas de la HL-Like1 clonada son comparables a las obtenidas en la fracción de citosol + retículo del testículo humano. Ocurre lo mismo con la HL y la fracción mitocondrial.**
- 8. El desarrollo de un anticuerpo, contra la secuencia comprendida entre los aminoácidos Ser¹⁶⁷ y el Asn¹⁷⁶ de la proteína HL-Like1, ha demostrado ser adecuado para reconocerla de manera específica, siendo incapaz de detectar a la HL.**
- 9. Los resultados de western-blot muestran al cerebro fetal como el único tejido con un nivel de proteína HL-Like1 apreciable. Sin embargo, el patrón de expresión de la proteína en tejidos adultos es más variado encontrándose niveles detectables en pulmón, riñón, corazón y cerebro.**
- 10. La HL sólo se expresa en riñón y pulmón fetales. Sin embargo, su patrón de actividad y expresión en tejidos adultos muestran al hígado como el órgano cetogénico por excelencia, y al páncreas como un nuevo tejido dónde la síntesis de cuerpos cetónicos pudiera ser importante.**
- 11. En cerebro adulto se ha detectado actividad de la HL-Like1 pero no de la HL. Estos datos sugieren que la HL-Like1 podría desempeñar un papel específico en cerebro y aclaran la controversia habitual sobre el origen de la actividad HMG-CoA liasa en este tejido.**
- 12. La tubulina es capaz de activar a la enzima HL-Like1, por medio de una interacción directa entre ambas proteínas producida, probablemente, a través de la hélice $\alpha 12$ de la HL-Like1.**

REFERENCIAS

7.1. Referencias bibliográficas.

- Adams M.D., Dubnick M., Kerlavage A.R., Moreno R., Kelley J.M., Utterback T.R., Nagle J.W., Fields C., Venter J.C. 1992. Sequence identification of 2,375 human brain genes. *Nature*. 355: 632-634.
- Altschul S.F., Lipman D.J. 1990. Protein database searches for multiple alignments. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87(14): 5509-5513.
- Altshuler E.P., Serebryanaya D.V., Katrukha A.G. 2010. Generation of recombinant antibodies and means for increasing their affinity. *Biochemistry (Mosc)*. 75(13): 1584-1605.
- Arahetes R.M., López J., Ramos M. 1986. Glucose and ketone bodies production in hepatocytes isolated from fetuses at term I. Effect of maternal fasting. *Comp Biochem Physiol B*. 83: 227-229.
- Arase K., Fisler J.S., Shargill N.S., York D.A., Bray G.A. 1988. Intracerebroventricular infusions of 3-OHB and insulin in a rat model of dietary obesity. *Am J Physiol*. 255: R974-981.
- Arce C.A., Casale C.H., Barra H.S. 2008. Submembraneous microtubule cytoskeleton: regulation of ATPases by interaction with acetylated tubulin. *FEBS J*. 275: 4664-4674.
- Ashmarina L.I., Rusnak N., Miziorko H.M., Mitchell G.A. 1994. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase is present in mouse and human liver peroxisomes. *J Biol Chem*. 269: 31929-31932.
- Ashmarina L.I., Robert M.F., Elsliger M.A., Mitchell G.A. 1996. Characterization of the hydroxymethylglutaryl-CoA lyase precursor, a

- protein targeted to peroxisomes and mitochondria. *Biochem J.* 315 (Pt 1): 71-75.
- Balasse E.O. 1979. Kinetics of ketone body metabolism in fasting humans. *Metabolism.* 28: 41-50.
 - Barrena H.C., Gazola V.A., Furlan M.M., García R.F., de Souza H.M., Bazotte R.B. 2009. Ketogenesis evaluation in perfused liver of diabetic rats submitted to short-term insulin-induced hypoglycemia. *Cell Biochem Funct.* 27: 383-387.
 - Baverel G., Ferrier B., Martin M. 1995. Fuel selection by the kidney: adaptation to starvation. *Proc Nutr Soc.* 54: 197-212.
 - Beaudry M.A., Chiasson J.L., Exton J.H. 1977. Gluconeogenesis in the suckling rat. *Am J Physiol.* 233: E175-180.
 - Bekesi A., Williamson D.H. 1990. An explanation for ketogenesis by the intestine of the suckling rat: the presence of an active hydroxymethylglutaryl-coenzyme A pathway. *Biol Neonate.* 58: 160-165.
 - Berne C. 1975. The metabolism of lipids in mouse pancreatic islets. The oxidation of fatty acids and ketone bodies. *Biochem J.* 152: 661-666.
 - Biden T.J., Taylor K.W. 1983. Effects of ketone bodies on insulin release and islet-cell metabolism in the rat. *Biochem J.* 212: 371-377.
 - Blázquez C., Sánchez C., Velasco G., Guzmán M. 1998. Role of carnitine palmitoyltransferase I in the control of ketogenesis in primary cultures of rat astrocytes. *J Neurochem.* 71: 1597-1606.
 - Blázquez E., Sugase T., Blázquez M., Foa P.P. 1974. Neonatal changes in the concentration of rat liver cyclic AMP and of serum glucose, free fatty acids, insulin, pancreatic, and total glucagon in man and in the rat. *J Lab Clin Med.* 83: 957-967.
 - Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
 - Brown M.S., Dana S.E., Goldstein J.L. 1973. Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in human fibroblasts by lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 70(7): 2162-2166.
 - Buckley B.M., Williamson D.H. 1973. Acetoacetate and brain lipogenesis: developmental pattern of acetoacetyl-coenzyme A synthetase in the soluble fraction of rat brain. *Biochem J.* 132: 653-656.
 - Burgess T.L., Skoufias D.A., Wilson L. 1991. Disruption of the Golgi apparatus with brefeldin A does not destabilize the associated

- detyrosinated microtubule network. *Cell Motil Cytoskeleton*. 20: 289-300.
- Callikan S., Ferre P., Pegorier J.P., Girard J.R., Marliss E.B., Assan R. 1979. Fuel metabolism in fasted newborn rabbits. *J Dev Physiol*. 1: 267-281.
 - Camarero N., Nadal A., Barrero M.J., Haro D., Marrero P.F. 2003. Histone deacetylase inhibitors stimulate mitochondrial HMG-CoA synthase gene expression via a promoter proximal Sp1 site. *Nucleic Acids Res*. 31: 1693-1703.
 - Carr B.R., Rainey W.E., Mason J.I. 1985. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in anencephalic and normal human fetal liver. *J Clin Invest*. 75(5): 1946-1949
 - Carrasco P., Menao S., López-Viñas E., Santpere G., Clotet J., Sierra A.Y., Gratacós E., Puisac B., Gómez-Puertas P., Hegardt F.G., Pié J. Casals N. 2007. C-terminal end and aminoacid Lys48 in HMG-CoA lyase are involved in substrate binding and enzyme activity. *Mol Genet Metab*. 91: 120-127.
 - Casale C.H., Casals N., Pié J., Zapater N., Pérez-Cerdá C., Merinero B., Martínez-Pardo M., García-Penas J.J., García-González J.M., Lama R., Poll-The B.T., Smeitink J.A., Wanders R.J., Ugarte M., Hegardt, F.G. 1998. A nonsense mutation in the exon 2 of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A lyase (HL) gene producing three mature mRNAs is the main cause of 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria in European Mediterranean patients. *Arch Biochem Biophys*. 349: 129-137.
 - Casale C.H., Alonso A.D., Barra H.S. 2001. Brain plasma membrane Na⁺,K⁺-ATPase is inhibited by acetylated tubulin. *Mol Cell Biochem*. 216: 85-92.
 - Casals N., Gómez-Puertas P., Pié J., Mir C., Roca R., Puisac B., Aledo R., Clotet J., Menao S., Serra D., Asins G., Till J., Elias-Jones A.C., Cresto J.C., Chamoles N.A., Abdenur J.E., Mayatepek E., Besley G., Valencia A., Hegardt, F.G. 2003. Structural (betaalpha)₈ TIM barrel model of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase. *J Biol Chem*. 278: 29016-29023.
 - Clinkenbeard K.D., Reed W.D., Mooney R.A., Lane M.D. 1975. Intracellular localization of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A cycle enzymes in liver. Separate cytoplasmic and mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A generating systems for cholesterologenesis and ketogenesis. *J Biol Chem*. 250: 3108-3116.
 - Cullingford T.E., Dolphin C.T., Bhakoo K.K., Peuchen S., Canevari L., Clark J.B. 1998. Molecular cloning of rat mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase and detection of the corresponding mRNA

- and of those encoding the remaining enzymes comprising the ketogenic 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA cycle in central nervous system of suckling rat. *Biochem J.* 329(Pt 2): 373-381.
- Chrétien D., Fuller S.D., Karsenti E. 1995. Structure of growing microtubule ends: two-dimensional sheets close into tubes at variable rates. *J Cell Biol.* 129(5): 1311-1328.
 - D'Alecy L.G., Lundy E.F., Kluger M.J., Harker C.T., LeMay D.R., Schlafer M. 1990. Beta-hydroxybutyrate and response to hypoxia in the ground squirrel, *Spermophilus tridecemlineatus*. *Comp Biochem Physiol B.* 96: 189-193.
 - Dashti N., Ontko J.A. 1979. Rate-limiting function of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase in ketogenesis. *Biochem Med.* 22: 365-374.
 - Desai A., Mitchison T.J. 1997. Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 13: 83-117.
 - Dhanya C.R., Indu A.R., Deepadevi K.V., Kurup P.A. 2003. Inhibition of membrane Na(+)-K+ Atpase of the brain, liver and RBC in rats administered di(2-ethyl hexyl) phthalate (DEHP) a plasticizer used in polyvinyl chloride (PVC) blood storage bags. *Indian J Exp Biol.* 41(8): 814-820.
 - Dompierre J.P., Godin J.D., Charrin B.C., Cordelieres F.P., King S.J., Humbert S., Saudou F. 2007. Histone deacetylase 6 inhibition compensates for the transport deficit in Huntington's disease by increasing tubulin acetylation. *J Neurosci.* 27: 3571-3583.
 - Eaton S. 2002. Control of mitochondrial beta-oxidation flux. *Prog Lipid Res.* 41(3): 197-239.
 - Edmond J. 1992. Energy metabolism in developing brain cells. *Can J Physiol Pharmacol.* 70 Suppl: S118-129.
 - Eiger S.M., Kirsch J.R., D'Alecy L.G. 1980. Hypoxic tolerance enhanced by beta-hydroxybutyrate-glucagon in the mouse. *Stroke.* 11: 513-517.
 - Etienne-Manneville S. (2009). From signaling pathways to microtubule dynamics: the key players. *Curr Opin Cell Biol.* 22(1): 104-111.
 - Faull K.F., Bolton P.D., Halpern B., Hammond J., Danks D.M. 1976. The urinary organic acid profile associated with 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria. *Clin Chim Acta.* 73: 553-559.
 - Ferré P., Pegorier J.P., Williamson D.H., Girard J.R. 1978. The development of ketogenesis at birth in the rat. *Biochem J.* 176: 759-765.

- Fisler J.S., Yoshida T., Bray G.A. 1984. Catecholamine turnover in S 5B/P1 and Osborne-Mendel rats: response to a high-fat diet. *Am J Physiol.* 247: R290-295.
- Foster P.C., Bailey E. 1976. Changes in the activities of the enzymes of hepatic fatty acid oxidation during development of the rat. *Biochem J.* 154: 49-56.
- Fox R.E., Hopkins I.B., Cabacungan E.T., Tildon J.T. 1996. The role of glutamine and other alternate substrates as energy sources in the fetal rat lung type II cell. *Pediatr Res.* 40: 135-141.
- Friedman J.R., Webster B.M., Mastronarde D.N., Verhey K.J., Voeltz G.K. 2010. ER sliding dynamics and ER-mitochondrial contacts occur on acetylated microtubules. *J Cell Biol.* 190: 363-375.
- Fu Z., Runquist J.A., Forouhar F., Hussain M., Hunt J.F., Miziorko H.M., Kim J.J. 2006. Crystal structure of human 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Lyase: insights into catalysis and the molecular basis for hydroxymethylglutaric aciduria. *J Biol Chem.* 281: 7526-7532.
- Fu Z., Runquist J.A., Montgomery C., Miziorko H.M., Kim J.J. 2010. Functional insights into human HMG-CoA lyase from structures of Acyl-CoA-containing ternary complexes. *J Biol Chem.* 285: 26341-26349.
- Fukao T., Song X.Q., Mitchell G.A., Yamaguchi S., Sukegawa K., Orii T., Kondo N. 1997. Enzymes of ketone body utilization in human tissues: protein and messenger RNA levels of succinyl-coenzyme A (CoA): 3-ketoacid CoA transferase and mitochondrial and cytosolic acetoacetyl-CoA thiolases. *Pediatr Res.* 42(4): 498-502.
- Fukao T., Lopaschuk G.D., Mitchell G.A. 2004. Pathways and control of ketone body metabolism: on the fringe of lipid biochemistry. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 70: 243-251.
- Giandomenico V., Simonsson M., Grönroos E., Ericsson J. 2003. Coactivator-dependent acetylation stabilizes members of the SREBP family of transcription factors. *Mol Cell Biol.* 23(7): 2587-2599.
- Girard J., Duee P.H., Ferre P., Pegorier J.P., Escriva F., Decaux J.F. 1985. Fatty acid oxidation and ketogenesis during development. *Reprod Nutr Dev.* 25: 303-319.
- Girard J.R., Cuendet G.S., Marliss E.B., Kervran A., Rieutort M., Assan R. 1973. Fuels, hormones, and liver metabolism at term and during the early postnatal period in the rat. *J Clin Invest.* 52: 3190-3200.
- Girard J.R., Ferre P., Gilbert M., Kervran A., Assan R., Marliss E.B. 1977. Fetal metabolic response to maternal fasting in the rat. *Am J Physiol.* 232: E456-463.

- Goberna R., Tamarit J. Jr., Osorio J., Fussganger R., Tamarit J., Pfeiffer E.F. 1974. Action of B-hydroxy butyrate, acetoacetate and palmitate on the insulin release in the perfused isolated rat pancreas. *Horm Metab Res.* 6: 256-260.
- Graham F.L., Smiley J., Russell W.C., Nairn R. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol.* 36: 59-74.
- Grantham B.D., Zammit V.A. 1988. Role of carnitine palmitoyltransferase I in the regulation of hepatic ketogenesis during the onset and reversal of chronic diabetes. *Biochem J.* 249: 409-414.
- Guex N., Peitsch M.C. 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PDB viewer. An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis.* 18(15): 2714-2723.
- Guex N., Diemand A., Peitsch M.C. 1999. Protein modeling for all TIBS. *Trends Biochem Sci.* 24(9): 364-367.
- Guo K., Lukacik P., Papagrigoriou E., Meier M., Lee W.H., Adamski J., Oppermann U. 2006. Characterization of Human DHRS6, an orphan short chain dehydrogenase/reductase enzyme. A novel, cytosolic type 2 R-b-hydroxybutyrate dehydrogenase. *J Biol Chem.* 281: 10291-10297.
- Gut A., Chaloner C., Schofield D., Sandle L.R., Purmasir M., Segal I., Braganza J.M. 1995. Evidence of toxic metabolite stress in black South Africans with chronic pancreatitis. *Clin Chim Acta.* 236: 145-153.
- Guzmán M., Blázquez C. 2004. Ketone body synthesis in the brain: possible neuroprotective effects. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 70: 287-292.
- Guzmán M., Geelen M.J. 1993. Regulation of fatty acid oxidation in mammalian liver. *Biochim Biophys Acta.* 1167: 227-241.
- Haave N.C., Innis S.M. 2001. Cholesterol synthesis and accretion within various tissues of the fetal and neonatal rat. *Metabolism.* 50(1): 12-18.
- Hahn P., Taller M. 1987. Ketone formation in the intestinal mucosa of infant rats. *Life Sci.* 41: 1525-1528.
- Hanaka S., Abe T., Itakura H., Matsumoto A. 2000. Gene expression related to cholesterol metabolism in mouse brain during development. *Brain Dev.* 22(5): 321-326.
- Harwood H.J. Jr., Schneider M., Stacpoole P.W. 1984. Measurement of human leukocyte microsomal HMG-CoA reductase activity. *J Lipid Res.* 25(9): 967-978.

- Hegardt F.G. 1999. Mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase: a control enzyme in ketogenesis. *Biochem J.* 338(Pt 3): 569-582.
- Herrera E. 2000. Metabolic adaptations in pregnancy and their implications for the availability of substrates to the fetus. *Eur J Clin Nutr.* 54 Suppl 1: S47-S51.
- Herrera E., Amusquivar E. 2000. Lipid metabolism in the fetus and the newborn. *Diabetes Metab Res Rev.* 16(3): 202-210.
- Herrera E. 2002. Implications of dietary fatty acids during pregnancy on placental, fetal and postnatal development-a review. *Placenta.* 23 Suppl A: S9-19.
- Hertel K.J. 2008. Combinatorial control of exon recognition. *J Biol Chem.* 283: 1211-1215.
- Hipolito-Reis C., Bailey E., Bartley W. 1974. Factors involved in control of activity of enzymes of hepatic ketogenesis during development of rat. *Int J Biochem.* 5: 31-39.
- Honda A., Salen G., Honda M., Batta A.K., Tint G.S., Xu G., Chen T.S., Tanaka N., Shefer S. 2000. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase activity is inhibited by cholesterol and up-regulated by sitosterol in sitosterolemic fibroblasts. *J Lab Clin Med.* 135: 174-179.
- Hooft R.W., Sander C., Scharf M., Vriend G. 1996. The PDBFINDER database: a summary of PDB, DSSP and HSSP information with added value. *Comput Appl Biosci.* 12(6): 525-529.
- Imamura K., Takeshima T., Kashiwaya Y., Nakaso K., Nakashima K. 2006. D-beta-hydroxybutyrate protects dopaminergic SH-SY5Y cells in a rotenone model of Parkinson's disease. *J Neurosci Res.* 84: 1376-1384.
- Iwata K., Kinoshita M., Yamada S., Imamura T., Uenoyama Y., Tsukamura H., Maeda K. 2011. Involvement of brain ketone bodies and the noradrenergic pathway in diabetic hyperphagia in rats. *J Physiol Sci.* 61(2): 103-113.
- Jain S.K., McVie R. 1999. Hyperketonemia can increase lipid peroxidation and lower glutathione levels in human erythrocytes in vitro and in type 1 diabetic patients. *Diabetes.* 48(9): 1850-1855.
- Janke C., Kneussel M. 2010. Tubulin post-translational modifications: encoding functions on the neuronal microtubule cytoskeleton. *Trends Neurosci.* 33: 362-372.
- Jo Y., Debose-Boyd R.A. 2010. Control of cholesterol synthesis through regulated ER-associated degradation of HMG CoA reductase. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 45: 185-198.

- Johnson J.M., Castle J., Garrett-Engele P., Kan Z., Loerch P.M., Armour C.D., Santos R., Schadt E.E., Stoughton R., Shoemaker D.D. 2003. Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays. *Science*. 302: 2141-2144.
- Juge N., Gray J.A., Omote H., Miyaji T., Inoue T., Hara C., Uneyama H., Edwards R.H., Nicoll R.A., Moriyama Y. 2010. Metabolic control of vesicular glutamate transport and release. *Neuron*. 68: 99-112.
- Kahler S.G., Sherwood W.G., Woolf D., Lawless S.T., Zaritsky A., Bonham J., Taylor C.J., Clarke J.T., Durie P., Leonard J.V. 1994. Pancreatitis in patients with organic acidemias. *J Pediatr*. 124: 239-243.
- Kampa D., Cheng J., Kapranov P., Yamanaka M., Brubaker S., Cawley S., Drenkow J., Piccolboni A., Bekiranov S., Helt G., Tammanna H., Gingeras T.R. 2004. Novel RNAs identified from an in-depth analysis of the transcriptome of human chromosomes 21 and 22. *Genome Res*. 14: 331-342.
- Kashiwaya Y., Takeshima T., Mori N., Nakashima K., Clarke K., Veech R.L. 2000. D-beta-hydroxybutyrate protects neurons in models of Alzheimer's and Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97: 5440-5444.
- Kimura R.E., Ilich J.Z. 1991. The oxidation of 3-hydroxybutyrate in developing rat jejunum. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 13: 347-353.
- Kodde I.F., van der Stok J., Smolenski R.T., de Jong J.W. 2007. Metabolic and genetic regulation of cardiac energy substrate preference. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 146: 26-39.
- Kramer P.R., Miziorko H.M. 1980. Purification and characterization of avian liver 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A lyase. *J Biol Chem*. 255: 11023-11028.
- Krisans S.K. 1996. Cell compartmentalization of cholesterol biosynthesis. *Ann N Y Acad Sci*. 804: 142-164.
- Laeger T., Metges C.C., Kuhla B. 2010. Role of beta-hydroxybutyric acid in the central regulation of energy balance. *Appetite*. 54: 450-455.
- Langan T.J., Iimori Y., White G., Volpe J.J. 1987. Regulation of sterol synthesis and of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by lipoproteins in glial cells in primary culture. *J Neurosci Res*. 17(4): 361-366.
- Langdon R.B., Counsell R.E. 1976. Determination of the michaelis-menten constant for beta-hydroxy-beta-methylglutaryl coenzyme A reductase. Demonstration of a substrate affinity 10-fold greater than previously reported. *J Biol Chem*. 251: 5820-5823.

- Laskowski R.A., MacArthur M.W., Moss D.S., Schendel P.F., McCoy J.M. 1993. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the E.coli cytoplasm. *Biotechnology (NY)*. 11(2): 187-193.
- Li J., Sheng Y., Tang P.Z., Tsai-Morris C.H., Dufau M.L. 2006. Tissue-cell- and species-specific expression of gonadotropin-regulated long chain acyl-CoA synthetase (GR-LACS) in gonads, adrenal and brain. Identification of novel forms in the brain. *J Steroid Biochem Mol Biol* 98(4-5): 207-217.
- Liscum L., Finer-Moore J., Stroud R.M., Luskey K.L., Brown M.S., Goldstein J.L. 1985. Domain structure of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, a glycoprotein of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 260: 522-530.
- Little M., Seehaus T. 1988. Comparative analysis of tubulin sequences. *Comp Biochem Physiol B*. 90: 655-670.
- Lockwood E.A., Bailey E. 1971. The course of ketosis and the activity of key enzymes of ketogenesis and ketone-body utilization during development of the postnatal rat. *Biochem J*. 124: 249-254.
- Lopes-Cardozo M., Koper J.W., Klein W., Van Golde L.M. 1984. Acetoacetate is a cholesterologenic precursor for myelinating rat brain and spinal cord. Incorporation of label from [3-14C]acetoacetate, [14C]glucose and 3H₂O. *Biochim Biophys Acta*. 794: 350-352.
- Lowe D.M., Tubbs P.K. 1985. Succinylation and inactivation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase by succinyl-CoA and its possible relevance to the control of ketogenesis. *Biochem J*. 232: 37-42.
- Lust W.D., Pundik S., Zechel J., Zhou Y., Buczek M., Selman W.R. 2003. Changing metabolic and energy profiles in fetal, neonatal, and adult rat brain. *Metab Brain Dis*. 18: 195-206.
- Ma W., Berg J., Yellen G. 2007. Ketogenic diet metabolites reduce firing in central neurons by opening K(ATP) channels. *J Neurosci*. 27(14): 3618-3625.
- Maalouf M., Sullivan P.G., Davis L., Kim D.Y., Rho J.M. 2007. Ketones inhibit mitochondrial production of reactive oxygen species production following glutamate excitotoxicity by increasing NADH oxidation. *Neuroscience*. 145: 256-264.
- Maalouf M., Rho J.M., Mattson M.P. 2009. The neuroprotective properties of calorie restriction, the ketogenic diet, and ketone bodies. *Brain Res Rev*. 59: 293-315.

- MacDonald M.J. 1995. Feasibility of a mitochondrial pyruvate malate shuttle in pancreatic islets. Further implication of cytosolic NADPH in insulin secretion. *J Biol Chem.* 270: 20051-20058.
- MacDonald M.J., Fahien L.A., Brown L.J., Hasan N.M., Buss J.D., Kendrick M.A. 2005. Perspective: emerging evidence for signaling roles of mitochondrial anaplerotic products in insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 288: E1-15.
- MacDonald M.J., Smith A.D. 3rd, Hasan N.M., Sabat G., Fahien L.A. 2007. Feasibility of pathways for transfer of acyl groups from mitochondria to the cytosol to form short chain acyl-CoAs in the pancreatic beta cell. *J Biol Chem.* 282: 30596-30606.
- Macdonald M.J., Longacre M.J., Stoker S.W., Kendrick M., Thonpho A., Brown L.J., Hasan N.M., Jitrapakdee S., Fukao T., Hanson M.S., Fernandez LA., Odorico J. 2011. Differences between Human and Rodent Pancreatic Islets: Low pyruvate carboxylase, ATP citrate lyase and pyruvate carboxylation and high glucose-stimulated acetoacetate in human pancreatic islets. *J Biol Chem.* 286: 18383-18396.
- Malaisse W.J., Lebrun P., Yaylali B., Camara J., Valverde I., Sener A. 1990. Ketone bodies and islet function: ⁴⁵Ca handling, insulin synthesis, and release. *Am J Physiol.* 259: E117-122.
- Maquat L.E. 2004. Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5(2): 89-99.
- Massieu L., Haces M.L., Montiel T., Hernández-Fonseca K. 2003. Acetoacetate protects hippocampal neurons against glutamate-mediated neuronal damage during glycolysis inhibition. *Neuroscience.* 120: 365-378.
- Matsuyama A., Shimazu T., Sumida Y., Saito A., Yoshimatsu Y., Seigneurin-Berny D., Osada H., Komatsu Y., Nishino N., Khochbin S., Horinouchi S., Yoshida M. 2002. In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *EMBO J.* 21: 6820-6831.
- Melichar V., Drahota Z., Hahn P. 1965. Changes in the blood levels of acetoacetate and ketone bodies in newborn infants. *Biol Neonat.* 8: 348-352.
- Menao S. 2006. Caracterización de una nueva isoforma de la HMG-CoA Liasa codificada por el gen *HMGCLL1*. Nuevo método de expresión de la enzima aplicado al estudio de variantes alélicas. Universidad de Zaragoza.
- Menao S., López-Viñas E., Mir C., Puisac B., Gratacós E., Arnedo M., Carrasco P., Moreno S., Ramos M., Gil-Rodríguez M.C., Pié A., Ribes A., Pérez-Cerdá C., Ugarte M., Clayton P.T., Korman S.H., Serra D.,

- Asins G., Ramos F.J., Gómez-Puertas P., Hegardt F.G., Casals N., Pié, J. 2009. Ten novel HMGCL mutations in 24 patients of different origin with 3-hydroxy-3-methyl-glutaric aciduria. *Hum Mutat.* 30: E520-529.
- Mitchell GA., Wang SP., Ashmarina L., Robert MF., Bouchard G., Laurin N., Kassovska-Bratinova S., Boukaftane Y. 1998. Inborn errors of ketogenesis. *Biochem Soc Trans.* 26(2): 136-140. (a)
 - Mitchell G.A., Ozand P.T., Robert M.F., Ashmarina L., Roberts J., Gibson K., Wanders R.J., Wang S., Chevalier I., Plochl E., Miziorko H. 1998. HMG CoA lyase deficiency: identification of five causal point mutations in codons 41 and 42, including a frequent Saudi Arabian mutation, R41Q. *Am J Hum Genet.* 62: 295-300. (b)
 - Miziorko H.M., Laib F.E., Behnke C.E. 1990. Evidence for substrate channeling in the early steps of cholesterol synthesis. *J Biol Chem.* 265: 9606-9609.
 - Montgomery C., Miziorko H.M. 2011. Influence of multiple cysteines on human 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase activity and formation of inter-subunit adducts. *Arch Biochem Biophys.* 511(1-2): 48-55.
 - Morris A.A. 2005. Cerebral ketone body metabolism. *J Inher Metab Dis.* 28: 109-121.
 - Muroi J., Yorifuji T., Uematsu A., Shigematsu Y., Onigata K., Maruyama H., Nobutoki T., Kitamura A., Nakahata T. 2000. Molecular and clinical analysis of Japanese patients with 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase (HL) deficiency. *Hum Genet.* 107: 320-326.
 - Nakatani T., Sakamoto Y., Ando H., Kobayashi K. 1996. Enhanced ketogenesis in the kidney during hepatic inflow occlusion with the administration of Ringer's acetate solution. *Surgery.* 119: 684-689.
 - Neel J.V., Weder A.B., Julius S. 1998. Type II diabetes, essential hypertension, and obesity as "syndromes of impaired genetic homeostasis": the "thrifty genotype" hypothesis enters the 21st century. *Perspect Biol Med.* 42(1): 44-74.
 - Nehlig A., Pereira de Vasconcelos A. 1993. Glucose and ketone body utilization by the brain of neonatal rats. *Prog Neurobiol.* 40: 163-221.
 - Nicolau G., Shefer S., Salen G., Mosbach E.H. 1974. Determination of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase activity in man. *J Lipid Res.* 15: 94-98.
 - Nieweg K., Schaller H., Pfriederger F.W. 2009. Marked differences in cholesterol synthesis between neurons and glial cells from postnatal rats. *J Neurochem.* 109(1): 125-134.

- Noh H.S., Hah Y.S., Nilufar R., Han J., Bong J.H., Kang S.S., Cho G.J., Choi, W.S. 2006. Acetoacetate protects neuronal cells from oxidative glutamate toxicity. *J Neurosci Res.* 83(4): 702-709.
- Ohgami M., Takahashi N., Yamasaki M., Fukui T. 2003. Expression of acetoacetyl-CoA synthetase, a novel cytosolic ketone body-utilizing enzyme, in human brain. *Biochem Pharmacol.* 65: 989-994.
- Ohnuki M., Takahashi N., Yamasaki M., Fukui T. 2005. Different localization in rat brain of the novel cytosolic ketone body-utilizing enzyme, acetoacetyl-CoA synthetase, as compared to succinyl-CoA: 3-oxoacid CoA-transferase. *Biochim Biophys Acta.* 1729: 147-153.
- Ortiz J.A., Gil-Gómez G., Casaroli-Marano R.P., Vilaro S., Hegardt F.G., Haro D. 1994. Transfection of the ketogenic mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase cDNA into Mev-1 cells corrects their auxotrophy for mevalonate. *J Biol Chem.* 269: 28523-28526.
- Outeiro T.F., Kontopoulos E., Altmann S.M., Kufareva I., Strathearn K.E., Amore A.M., Volk C.B., Maxwell M.M., Rochet J.C., McLean P.J., Young A.B., Abagyan R., Feany M.B., Hyman B.T., Kazantsev A.G. 2007. Sirtuin 2 inhibitors rescue alpha-synuclein-mediated toxicity in models of Parkinson's disease. *Science.* 317: 516-519.
- Ozand P.T., al Aqeel A., Gascon G., Brismar J., Thomas E., Gleispach H. 1991. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) lyase deficiency in Saudi Arabia. *J Inherit Metab Dis.* 14: 174-188.
- Palazzo A., Ackerman B., Gundersen G.G. 2003. Cell biology: Tubulin acetylation and cell motility. *Nature.* 421: 230.
- Peitsch M.C. 1995. Protein modeling by e-mail. *Biotechnology.* 13: 658-660.
- Peitsch M.C. 1996. Promod and Swiss-Model: internet based tools for automated comparative protein modeling. *Bioche Soc Trans.* 24(1): 274-279.
- Pelletier A., Coderre L. 2007. Ketone bodies alter dinitrophenol-induced glucose uptake through AMPK inhibition and oxidative stress generation in adult cardiomyocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 292(5): E1325-1332.
- Perdiz D., Mackeh R., Pous C., Baillet A. 2011. The ins and outs of tubulin acetylation: more than just a post-translational modification? *Cell Signal.* 23: 763-771.
- Pie J., Casals N., Casale C.H., Buesa C., Mascaro C., Barcelo A., Rolland M.O., Zobot T., Haro D., Eyskens F., Divry P., Hegardt F.G. 1997. A nonsense mutation in the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase gene produces exon skipping in two patients of different origin

- with 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency. *Biochem J.* 323(Pt 2): 329-335.
- Platt M.W., Deshpande S. 2005. Metabolic adaptation at birth. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine.* 10: 341-350.
 - Prins M.L. 2008. Cerebral metabolic adaptation and ketone metabolism after brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 28: 1-16.
 - Prip-Buus C., Thumelin S., Chatelain F., Pegorier J.P., Girard J. 1995. Hormonal and nutritional control of liver fatty acid oxidation and ketogenesis during development. *Biochem Soc Trans.* 23: 500-506.
 - Puchowicz M.A., Emancipator D.S., Xu K., Magness D.L., Ndubuizu O.I., Lust W.D., LaManna J.C. 2005. Adaptation to chronic hypoxia during diet-induced ketosis. *Adv Exp Med Biol.* 566: 51-57.
 - Puisac B., Arnedo M., Casale C.H., Ribate M.P., Castiella T., Ramos F.J., Ribes A., Pérez-Cerda C., Casals N., Hegardt F.G., Pié J. 2010. Differential HMG-CoA lyase expression in human tissues provides clues about 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria. *J Inherit Metab Dis.* 33: 405-410.
 - Puisac B., Ramos M., Arnedo M., Menao S., Gil-Rodríguez M.C., Teresa-Rodrigo M.E., Pié A., de Karam J.C., Wesselink J-J., Giménez I., Ramos F.J., Casals N., Gómez-Puertas P., Hegardt F.G., Pié J. 2011. Characterization of splice variants of the genes encoding human mitochondrial HMG-CoA lyase and HMG-CoA synthase, the main enzymes of the ketogenesis pathway. *Mol Biol Rep.* [Epub ahead of print].
 - Reed N.A., Cai D., Blasius T.L., Jih G.T., Meyhofer E., Gaertig J., Verhey K.J. 2006. Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Curr Biol.* 16: 2166-2172.
 - Reese M.G., Eeckman F.H., Kulp D., Haussler D. 1997. Improved splice site detection in Genie. *J Comput Biol.* 4: 311-323.
 - Rhodes C.J., Campbell I.L., Szopa T.M., Biden T.J., Reynolds P.D., Fernando O.N., Taylor K.W. 1985. Effects of glucose and D-3-hydroxybutyrate on human pancreatic islet cell function. *Clin Sci (Lond).* 68: 567-572.
 - Richie D.W., Kemp G.J. 2000. Protein docking using spherical polar Fourier correlations. *Proteins.* 39(2): 178-194.
 - Rickers A., Rininsland F., Osborne L., Reiss J. 1994. Skipping of multiple CFTR exons is not a result of single exon omissions. *Hum Genet.* 94(3): 311-313.
 - Roberts J.R., Narasimhan C., Hruz P.W., Mitchell G.A., Miziorko H.M. 1994. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase: expression and isolation

- of the recombinant human enzyme and investigation of a mechanism for regulation of enzyme activity. *J Biol Chem.* 269: 17841-17846.
- Roberts J.R., Narasimhan C., Miziorko H.M. 1995. Evaluation of cysteine 266 of human 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase as a catalytic residue. *J Biol Chem.* 270: 17311-17316.
 - Roberts J.R., Mitchell G.A., Miziorko H.M. 1996. Modeling of a mutation responsible for human 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency implicates histidine 233 as an active site residue. *J Biol Chem.* 271: 24604-24609.
 - Roberts J.R., Miziorko H.M. 1997. Evidence supporting a role for histidine-235 in cation binding to human 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase. *Biochemistry.* 36: 7594-7600.
 - Robinson A.M., Williamson D.H. 1977. Effects of acetoacetate administration on glucose metabolism in mammary gland of fed lactating rats. *Biochem J.* 164: 749-752.
 - Robinson A.M., Williamson D.H. 1980. Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues. *Physiol Rev.* 60: 143-187.
 - Saggerson D. 2008. Malonyl-CoA, a key signaling molecule in mammalian cells. *Annu Rev Nutr.* 28: 253-272.
 - Schemies J., Sippl W., Jung M. 2009. Histone deacetylase inhibitors that target tubulin. *Cancer Lett.* 280: 222-232.
 - Shah S.N. 1982. Cytosolic 3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme a synthase in rat brain: properties and developmental change. *Neurochem Res.* 7(11): 1359-1366.
 - Sippl M.J. 1993. Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Proteins.* 17(4): 355-362.
 - Squires J.E., Sun J., Caffrey J.L., Yoshishige D., Mallet R.T. 2003. Acetoacetate augments beta-adrenergic inotropism of stunned myocardium by an antioxidant mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 284(4): H1340-1347.
 - Stamm S., Ben-Ari S., Rafalska I., Tang Y., Zhang Z., Toiber D., Thanaraj T.A., Soreq H. 2005. Function of alternative splicing. *Gene.* 344: 1-20.
 - Strachan T. 1992. *The Human Genome.* BioScientific Publishers, Oxford.
 - Strausberg R.L., Feingold E.A., Grouse L.H., Derge J.G., Klausner R.D., Collins F.S., Wagner L., Shenmen C.M., Schuler G.D., Altschul S.F., Zeeberg B., Buetow K.H., Schaefer C.F., Bhat N.K., Hopkins R.F., Jordan H., Moore T., Max S.I., Wang J., Hsieh F., Diatchenko L.,

- Marusina K., Farmer A.A., Rubin G.M., Hong L., Stapleton M., Soares M.B., Bonaldo M.F., Casavant T.L., Scheetz T.E., Brownstein M.J., Usdin T.B., Toshiyuki S., Carninci P., Prange C., Raha S.S., Loquellano N.A., Peters G.J., Abramson R.D., Mullahy S.J., Bosak S.A., McEwan P.J., McKernan K.J., Malek J.A., Gunaratne P.H., Richards S., Worley K.C., Hale S., Garcia A.M., Gay L.J., Hulyk S.W., Villalon D.K., Muzny D.M., Sodergren E.J., Lu X., Gibbs R.A., Fahey J., Helton E., Kettelman M., Madan A., Rodrigues S., Sanchez A., Whiting M., Madan A., Young A.C., Shevchenko Y., Bouffard G.G., Blakesley R.W., Touchman J.W., Green E.D., Dickson M.C., Rodriguez A.C., Grimwood J., Schmutz J., Myers R.M., Butterfield Y.S., Krzywinski M.I., Skalska U., Smailus D.E., Schnerch A., Schein J.E., Jones S.J., Marra M.A. 2002. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99: 16899-16903.
- Sweetman L., Williams J.C. 2001. Branched Chain Organic Acidurias. In: *The Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease* (D. Valle ed). Mc Graw-Hill.
 - Thomas L.K., Ittmann M., Cooper C. 1982. The role of leucine in ketogenesis in starved rats. *Biochem J*. 204: 399-403.
 - Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. 1994. CLUSTALW: improving the sensivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res*. 22(2): 4673-4680.
 - Thumelin S., Forestier M., Girard J., Pegorier J.P. 1993. Developmental changes in mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene expression in rat liver, intestine and kidney. *Biochem J*. 292(Pt 2): 493-496.
 - Tieu K., Perier C., Caspersen C., Teismann P., Wu D.C., Yan S.D., Naini A., Vila M., Jackson-Lewis V., Ramasamy R., Przedborski S. 2003. D-beta-hydroxybutyrate rescues mitochondrial respiration and mitigates features of Parkinson disease. *J Clin Invest*. 112: 892-901.
 - Tuinstra R.L., Burgner J.W. 2nd., Miziorko H.M. 2002. Investigation of the oligomeric status of the peroxisomal isoform of human 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase. *Arch Biochem Biophys*. 408: 286-294.
 - Tuinstra R.L., Miziorko H.M. 2003. Investigation of conserved acidic residues in 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase: implications for human disease and for functional roles in a family of related proteins. *J Biol Chem*. 278: 37092-37098.
 - Van der Auwera I., Wera S., Van Leuven F., Henderson S.T. 2005. A ketogenic diet reduces amyloid beta 40 and 42 in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nutr Metab (Lond)*. 17(2): 28.

- Veech R.L., Chance B., Kashiwaya Y., Lardy H.A., Cahill G.F. Jr. 2001. Ketone bodies, potential therapeutic uses. *IUBMB Life*. 51: 241-247.
- Vriend G. 1990. WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *J Mol Graph*. 8(1): 52-56.
- Wanders R.J., Schutgens R.B., Zoeters P.H. 1988. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase in human skin fibroblasts: study of its properties and deficient activity in 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria patients using a simple spectrophotometric method. *Clin Chim Acta*. 171: 95-101.
- Wang S., Soni K.G., Semache M., Casavant S., Fortier M., Pan L., Mitchell G.A. 2008. Lipolysis and the integrated physiology of lipid energy metabolism. *Mol Genet Metab*. 95: 117-126.
- Wang S.P., Robert M.F., Gibson K.M., Wanders R.J., Mitchell G.A. 1996. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase (HL): mouse and human HL gene (HMGCL) cloning and detection of large gene deletions in two unrelated HL-deficient patients. *Genomics*. 33: 99-104.
- Wang S.P., Marth J.D., Oligny L.L., Vachon M., Robert M.F., Ashmarina L., Mitchell G.A. 1998. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase (HL): gene targeting causes prenatal lethality in HL-deficient mice. *Hum Mol Genet*. 7: 2057-2062.
- Williamson D.H., Bates M.W., Krebs H.A. 1968. Activity and intracellular distribution of enzymes of ketone-body metabolism in rat liver. *Biochem J*. 108: 353-361.
- Williamson D.H., Bates M.W., Page M.A., Krebs H.A. 1971. Activities of enzymes involved in acetoacetate utilization in adult mammalian tissues. *Biochem J*. 121: 41-47.
- Wilson W.G., Cass M.B., Sovik O., Gibson K.M., Sweetman L. 1984. A child with acute pancreatitis and recurrent hypoglycemia due to 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency. *Eur J Pediatr*. 142: 289-291.
- Yamada T., Zhang S.J., Westerblad H., Katz A. 2010. β -Hydroxybutyrate inhibits insulin-mediated glucose transport in mouse oxidative muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 299: E364-373.
- Yamasaki M., Hasegawa S., Suzuki H., Hidai K., Saitoh Y., Fukui T. 2005. Acetoacetyl-CoA synthetase gene is abundant in rat adipose, and related with fatty acid synthesis in mature adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 335: 215-219.
- Zammit V.A. 1981. Regulation of hepatic fatty acid metabolism. The activities of mitochondrial and microsomal acyl-CoA:sn-glycerol 3-phosphate O-acyltransferase and the concentrations of malonyl-CoA, non-esterified and esterified carnitine, glycerol 3-phosphate, ketone

bodies and long-chain acyl-CoA esters in livers of fed or starved pregnant, lactating and weaned rats. *Biochem J.* 198: 75-83.

- Zammit V.A., Moir A.M. 1994. Monitoring the partitioning of hepatic fatty acids in vivo: keeping track of control. *Trends Biochem Sci.* 19: 313-317.
- Zhao Z., Lange D.J., Voustianiouk A., MacGrogan D., Ho L., Suh J., Humala N., Thiyagarajan M., Wang J., Pasinetti G.M. 2006. A ketogenic diet as a potential novel therapeutic intervention in amyotrophic lateral sclerosis. *BMC Neurosci.* 7: 29.
- Zorzano A., Fandos C., Palacin M. 2000. Role of plasma membrane transporters in muscle metabolism. *Biochem J.* 349(Pt 3): 667-688.

7.2. Referencias localizadas en la red

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest>. Base de datos de ESTs de UniGene del NCBI.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>. "The Mammalian Gene Collection". Base de datos de cDNAs completos humanos.

<http://www.ensembl.org/> "Ensembl". Base de datos de cDNAs completos humanos.

www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ Programa para buscar homología de secuencias de DNA o proteínas.

<http://www.uniprot.org>. Base de datos donde se encuentran depositadas todas las secuencias de proteínas conocidas.

http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html "Splice Site Prediction by Neural Network". Programa de cálculo del grado de fortaleza de las secuencias consenso.

ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
AACS	Acetoacetil-CoA Sintetasa
ATP	Adenosín 5´ trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
c.s.p	Cantidad suficiente para
cDNA	DNA codificante
CoA	Coenzima A
CPT-I	Carnitina Palmitoiltransferasa 1
cs	Cover-slip
DMEN	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleótidos
DO ₅₉₅	Densidad óptica a 595 nanómetros
DTT	Ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etilendiaminotetraacetato
ESTs	Expresión Sequence tags
et al	Y otros
FCS	Fetal Calf Serum (Suero Fetal Bovino)
gr o g	Gramo
HEK293	Línea celular "Human Embryonic Kidney 293"
HL	HMG-CoA Liasa
HL-Like1	HMG-CoA Liasa Like1

<i>HMGCL</i>	Gen de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA liasa
<i>HMGCLL1</i>	Gen de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA liasa Like 1
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA
<i>HMGCR</i> o HMGCR	Gen o proteína 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa
<i>HMGCS2</i>	Gen de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa mitocondrial
IPTG	Isopropiltiogalactosido
Kb	Kilobase
KDa	Kilodalton
Km	Constante de Michaelis-Menten
L	Litro
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
M	Molar
MBP	Maltosa Binding Protein
mg	Miligramo
mHS	HMG-CoA sintasa mitocondrial
min	Minuto
MK	Molecular Marker
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MT	Microtúbulo
mA	Miliamperio
N	Normal
n.d.	No detecta
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
NADPH	Dinucleótido fosfato de nicotinamida y adenina
ng	Nanogramo
nm	Nanometro
NMD	Nonsense-mediated mRNA decay
NT	No transfectado
°C	Grado centígrado
O/N	Toda la noche
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFA	Paraformaldehído
pmol	Picomol
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Reactive Oxygen Specie (Especie reactiva de oxígeno)
rpm	Revoluciones por minuto
SEM	Error estándar de la media
SCOT	Succinil-CoA Transferasa
SDS	Dodecil sulfato sódico
TBE	Tris-borato-EDTA

TEMED	N,N,N,N' - tetrametilendiamino
U	Unidades internacionales
VGLUT	Vesicular glutamate transporter (Transportador vesicular de glutamato)
Vmax	Velocidad máxima
v/v	Concentración volumen / volumen
WT	Wild type
UTR	UnTranslated Region (Región no traducida)
xg	Unidades de gravedad
ϵ	Coefficiente de extinción molar
μg	Microgramo
μl	Microlitro
μM	Micromolar
μmol	Micromol
Φ	Vacío
'	Minuto
"	Segundo
1X	Una vez concentrado
10x	Diez veces concentrado
2X	Dos veces concentrado
3D	Tridimensional
5X	Cinco veces concentrado

SÍMBOLOS DE LOS AMINOÁCIDOS

A	Ala	Alanina
C	Cys	Cisteína
D	Asp	Ácido aspártico
E	Glu	Ácido glutámico
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

PUBLICACIONES

- **Menao S., López-Viñas E., Mir C., Puisac B., Gratacos E., Arnedo M., Carrasco P., Moreno S., Ramos M., Gil M.C., Pie A., Ribes A., Perez-Cerda C., Ugarte M., Clayton P.T., Korman S.H., Serra D., Asins G., Ramos F.J., Gomez-Puertas P., Hegardt F.G., Casals N., Pie J. 2009. Ten novel *HMGCL* mutations in 24 patients of different origin with 3-hydroxy-3-methyl-glutaric aciduria. *Hum Mutat* 30(3): E 520-9.**
- **Puisac B., Arnedo M., Casale C.H., Ribate M.P., Castiella T., Ramos F.J., Ribes A., Pérez-Cerdá C., Casals N., Hegardt F.G., Pié J. 2010. Differential HMG-CoA lyase expression in human tissues provides clues about 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria. *J Inherit Metab Dis.* 33(4):405-10.**

Ten Novel *HMGCL* Mutations in 24 Patients of Different Origin with 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaric Aciduria

Sebastián Menao¹, Eduardo López-Viñas^{2,9}, Cecilia Mir³, Beatriz Puisac¹, Esther Gratacós³, María Arnedo¹, Patricia Carrasco³, Susana Moreno¹, Mónica Ramos¹, María Concepción Gil¹, Ángeles Pié¹, Antonia Ribes⁴, Celia Pérez-Cerda⁵, Magdalena Ugarte⁵, Peter T. Clayton⁶, Stanley H. Korman⁷, Dolors Serra^{8,9}, Guillermina Asins^{8,9}, Feliciano J. Ramos¹, Paulino Gómez-Puertas^{2,9}, Fausto G. Hegardt^{8,9}, Nuria Casals³, and Juan Pié^{1*}

¹Laboratory of Clinical Genetics and Functional Genomics. Departments of Pharmacology-Physiology and Pediatrics, Medical School, University of Zaragoza, Zaragoza, Spain.; ²Molecular Modelling Group, Center of Molecular Biology "Severo Ochoa" (CSIC-UAM), Cantoblanco, Madrid, Spain.; ³Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Health Sciences, International University of Catalonia, Sant Cugat, Barcelona, Spain.; ⁴Division of Inborn Errors of Metabolism (IBC), Department of Biochemistry and Molecular Genetics, Hospital Clinic and CIBERER, Barcelona, Spain.; ⁵Department of Molecular Biology, Molecular Biological Center "Severo Ochoa" CSIC-UAM, University Autònoma of Madrid, CIBERER, Madrid, Spain.; ⁶Great Ormond Street Children's Hospital, London, United Kingdom.; ⁷Metabolic Diseases Unit, Hadassah-Hebrew University Medical Center, Jerusalem, Israel.; ⁸Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain.; ⁹CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III, Spain.

*Correspondence to: Juan Pié, Laboratory of Clinical Genetics and Functional Genomics, Department of Pharmacology and Physiology, School of Medicine, Zaragoza University, c/ Domingo Miral s/n, E-50009 Zaragoza, Spain; Tel: + 34 976 76 16 77; Fax: +34 976 76 17 00; E-mail: juanpie@unizar.es.

Contract grant sponsor: Diputación General de Aragón (Grupos de Investigación Consolidados); Contract grant number: B20

Communicated by Elizabeth F. Neufeld

ABSTRACT: 3-Hydroxy-3-methylglutaric aciduria is a rare autosomal recessive genetic disorder that affects ketogenesis and L-leucine catabolism. The clinical acute symptoms include vomiting, convulsions, metabolic acidosis, hypoketotic hypoglycaemia and lethargy. To date, 33 mutations in 100 patients have been reported in the *HMGCL* gene. In this study 10 new mutations in 24 patients are described. They include: 5 missense mutations: c.109G>A, c.425C>T, c.521G>A, c.575T>C and c.598A>T, 2 nonsense mutations: c.242G>A and c.559G>T, one small deletion: c.853delC, and 2 mutations in intron regions: c.497+4A>G and c.750+1G>A. Two prevalent mutations were detected, 109G>T (E37X) in 38% of disease alleles analyzed and c.504_505delCT in 10% of them. Although patients are mainly of European origin (71%) and mostly Spanish (54%), the group is ethnically diverse and includes, for the first time, patients from Pakistan, Palestine and Ecuador. We also present a simple, efficient method to express the enzyme and we analyze the possible functional effects of missense mutations. The finding that all identified missense mutations cause a >95% decrease in the enzyme activity, indicates that the disease appears only in very severe genotypes." © 2009 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria, *HMGCL*, HMG-CoA lyase, mutations, ketone bodies

INTRODUCTION

3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) lyase (HL) (EC 4.1.3.4) is a TIM Barrel structure (Casals, et al., 2003; Fu, et al., 2006) mitochondrial enzyme that catalyzes the cleavage of HMG-CoA into acetyl-CoA and acetoacetic acid. Its absence causes HL deficiency or 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria (MIM# 246450), a rare autosomal recessive genetic disorder that affects ketogenesis and L-leucine catabolism. The disease usually appears in the first year of life after a fasting period and its clinical acute symptoms include vomiting, seizures, metabolic acidosis, hypoketotic hypoglycaemia and lethargy (Faull, et al., 1976). These symptoms sometimes progress to coma, with fatal outcome in about 20% of cases (Sweetman and Williams, 2001). Its prevalence is less than 1/100,000 liveborns. This disease belongs to a group of 29 genetic conditions for which effective treatment is available. The American College of Medical Genetics (ACMG) (Watson, et al., 2006) and the Health Council of the Netherlands (Bolhuis and Page-Christiaens, 2005) have recommended that hospitals with neonate units should be able to diagnose this condition.

The *HMGCL* gene (GenBank NM_000191.2), located in the short arm of chromosome 1 (1p36.1-p35), between *FUCA1* and *TCEB3*, has 9 exons with a total of 24,336 base pairs and codifies human HL. Its 5'-untranslated region bears the characteristic elements of a housekeeping gene, as well as a CpG island that contains binding sites for SP1. There is no evidence for either a TATA box or a CAAT box (Wang, et al., 1996).

To date, 34 variant alleles (33 mutations and 1 SNP) in 100 patients (Figure 1) have been reported in the *HMGCL* gene (two cases were fetuses) (Koling, et al., 2000; Pié, et al., 2007; Vargas, et al., 2007; Zafeiriou, et al., 2007). In the coding region, missense mutations are the most frequent (16), followed by frameshift deletions (5) or insertions (1), nonsense mutations (4) and large deletions (3). Three mutations that cause aberrant splicing have been found in intron sequences. These mutations are uniformly distributed along the gene sequence, although some clustering is observed in exon 2, which has been considered a hot spot (Pié, et al., 2003). The most frequent mutation reported worldwide is c.122G>A, found almost exclusively in patients from Saudi Arabia (Al-Sayed, et al., 2006; Mitchell, et al., 1998; Pie, et al., 2007).

This paper reviews the retrospective genetic studies performed in the last 9 years in 24 patients from different ethnic backgrounds affected by 3-Hydroxy-3-methylglutaric aciduria. The new allelic variants described here comprise about one fourth of all the variants known for this gene. We also propose a simple, efficient method to express the enzyme and we analyze the possible functional effects of missense mutations.

MATERIAL AND METHODS

Patients

Twenty-four cases (one was a fetus) with HL deficiency were studied. Nine patients (cases 3, 5, 6, 7, 8, 10, 14, 20 and 21) become symptomatic during the neonatal period, five (cases 2, 4, 13, 22 and 23) between 3 and 12 months of age and three (cases 11, 12 and 18) during the second year of life. Special cases were: case 1, whose symptoms started at 12 years of age; case 9, who did not develop any symptoms; and case 15, who was a fetus (prenatal diagnosis). In most patients, the triggering event was hypoglycemia, although three of them became sick after an intercurrent illness (cases 1, 12 and 18). All patients developed an acute disease with hypoketotic hypoglycemia and metabolic acidosis. Case 4 had 3 acute episodes. The most frequent complication was hepatic involvement with hepatomegaly (cases 8, 9, 10, 21 and 22) and elevation of transaminases (cases 10, 18 and 20). Functional neurologic symptoms (cases 7, 13 and 18) included axial hypotonia and limb hypertonia (case 7), and clonic movements (case 18). Elevation of organic acids levels in urine was reported in 14 out of 24 patients, who showed increased 3-hydroxy-isovaleric, 3-methylglutaric, 3-methylglutaconic, methylcrotonyl glycine and 3-hydroxy-3-methylglutaric acids. In cases 12, 22 and 23, HL deficiency was confirmed by low fibroblast enzyme activity (<5%). Although all patients received appropriate treatment, three died (cases 6, 10 and 14). DNAs were sent to our center for genetic analysis. Relatives were examined when available. Informed consent for genetic analysis was obtained in all the families studied.

Mutational analysis

Genomic DNA was extracted from blood samples and amniotic fluid (case 15) with “DNAzol® Reagent Kit” from Invitrogen. In case 11, DNA was extracted from blood impregnated cardboard samples with Promega “Ready Amp Genomic DNA Purification Resin” Kit. Oligonucleotides used to amplify nine exons of the *HMGCL* gene and their splice junctions are reported elsewhere (Wang, et al., 1996). When RNA or fibroblasts were available (cases 5 and 16), five overlapping RT-PCR fragments were generated to cover the cDNA sequence of the coding region completely. PCR products were purified with “QIAquick PCR Purification Kit” or “QIAquick Gel Extraction Kit” from Qiagen and sequenced in two directions with the Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit and the ABI Prism 377 Genetic analyzer from Applied Biosystems. We checked the sequence variants using the Mutalizer program (Wildeman, et al., 2008).

Construction of the expression plasmid pMAL-c2x-HL

A DNA fragment encoding HL without the signal peptide was amplified by PCR using the previously constructed plasmid pTr-HLwt (Casals, et al., 2003) as a template, and primers *HLBamF* (5'-GCATGGATCCACTTTACCAAAGCGGGTG-3') and *HLBamR* (5'-CGGGTGGACCTAGGGACCCC-3'). These primers contain the *Bam*HI restriction sequence. This fragment was subsequently cloned into the expression plasmid pMAL-c2x, which incorporates the codifying sequence of the fusion protein Maltose Binding Protein (MBP). The construct was transformed into the strain BL21-Codon Plus (DE3)-RIPL (Novagen). Finally, positive clones were confirmed by nucleotide sequencing.

Expression and purification of the HL

E. coli strain BL21-Codon Plus (DE3)-RIPL expressing MBP-HL was grown in LB medium containing 0.1 mg/mL ampicillin to an A_{600} of 1.0 at 37 °C. Optimal protein expression was induced with 0.2 mM IPTG at 18 °C for 16 h. Cells were recovered by centrifugation at 4000xg at 4 °C for 15 min. Then, the cells were resuspended in lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mg/mL Lysozyme, 10 µg/mL DNase, 10 µg/mL RNase, 100 µg/mL PMSF, 1 mM DTT, 0.1% Triton X-100 and 10% glycerol) and disrupted by sonication at 4 °C. The soluble fraction containing the MBP-HL fusion protein was loaded into an amylose affinity column, which had been washed with 3 column volumes of buffer 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA and 1 mM DTT. The HL was eluted from the affinity resin using a buffer containing the protease factor Xa.

Protein and enzyme assays

Protein was quantified by Bradford's method and analyzed by SDS-PAGE using a 12% acrylamide running gel and a 5% acrylamide stacking gel. HMG-CoA lyase activity was measured by a simple spectrophotometric method that determines the amount of acetoacetate produced (Wanders, et al., 1988).

Mutants

Using Quick Change PCR-based mutagenesis (Stratagene), new missense mutations were induced in the wild-type HL cDNA. Five primer pairs were used and these are available on request. DNA sequencing of the new constructs was performed to confirm target mutations. Conditions of expression and enzymatic assay were the same as those used for the wild-type protein

Bioinformatic analysis

Sequences of homologous proteins to human HL were obtained using BLAST (Altschul and Lipman, 1990). Multiple alignments to analyze conservation were performed using ClustalW (Thompson, et al., 1994). Location of residues and generation of protein plot were performed using PyMOL (DeLano Scientific, San Carlos, CA). Atomic coordinates of the 3-D structure of human HMG-CoA lyase in complex with 3-hydroxypentanedioic acid (3-hydroxyglutaric acid) (Fu, et al., 2006) were obtained from the Protein Data Bank (entry 2CW6).

RESULTS

Twenty-four patients were diagnosed at molecular level. More than 50% were Spanish (13 cases), and the remaining were: 2 English, 2 Pakistan, 2 Palestinian, 1 Argentinian, 1 Ecuatorian, 1 French, 1 Moroccan, and 1 Portuguese (Table 1). In 23 patients mutations were identified in both alleles, and in patient 17 only in one allele. Previously, in patient 22, c.144G>T (K48N) mutation of one allele was reported (Carrasco, et al., 2007). In all the patients in which parental DNA was available (cases 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 17 and 18), inheritance was confirmed.

We identified a total of 16 different allelic variants, 11 of which are reported for the first time (10 mutations and 1 polymorphism) (Table 1) (Figure 1). Of these new mutations, 5 were missense mutations: c.109G>A (p.E37K), c.425C>T (p.S142F), c.521G>A (p.C174Y), c.575T>C (p.F192S) and c.598A>T (I200F), 2 were nonsense mutations: c.242G>A (p.W81X) and c.559G>T (p.E187X), one was a small deletion: c.853delC (p.L285X), and 2 were mutations in intronic regions: c.497+4A>G (p.A118RfsX10/p.V117_E187del) and c.750+1G>A (r.spl?). The SNP c.252+34C>T identified in intron 3 of patient 11 was already registered in the dbSNP database (rs2076344). We also found 5 mutations previously reported: 2 missense mutation c.125A>G (p.D42G) (Mitchell, et al., 1998) and c.698A>G (p.H233R) (Roberts, et al., 1996), one nonsense mutation c.109G>T (p.E37X) (Pié, et al., 1997), and 2 deletions c.202_207delCT (p.S69CfsX11) (Mitchell, et al., 1993) and c.504_505delCT (p.S169LfsX8) (Casals, et al., 1997) (Table 1) (Figure 1).

To examine the effect of the new missense mutations on enzyme activity, we validated a method of expression of HL in *E.coli* by using the pMAL-c2x plasmid, which encodes the MBP fusion protein. The HL assay (Wanders et al., 1988) was performed in reductive conditions because the enzyme was more active than in oxidative conditions (Roberts et al., 1994; Hruz and Miziorko, 1992). Although the enzyme in nature is a dimer linked by disulfide bonds, in this redox state HL is a monomer, indicating that there is no protein-protein interaction that might modify the activity values. All recombinant proteins (p.E37K, p.S142F, p.C174Y, p.F192S, p.I200F) generated from these mutations showed an specific activity and Km no detectable (Table 2).

Table 1. Allelic variants of the *HMGCL* gene found in patients of this study.

Allelic variants	Exon/ Intron	Aminoacid or mRNA changes	Patient code	Ethnic Origin	Mutant alleles	References
Non reported before						
<i>Missense mutations</i>						
c.109G>A	E2	p.E37K*	8, 9	2 Pakistani	4	This study
c.425C>T	E5	p.S142F*	18	1 Spanish	1 (1 ht)	This study
c.521G>A	E6	p.C174Y*	11	1 Palestinian	2	This study
c.575T>C	E7	p.F192S*	12	1 Spanish	2	This study
c.598A>T	E7	p.I200F*	13	1 French	2	This study
<i>Nonsense mutations</i>						
c.242G>A	E3	p.W81X	10	1 Ecuadorian	2	This study
c.559G>T	E6	p.E187X	18	1 Spanish	1 (1 ht)	This study
<i>Deletions</i>						
c.853delC	E8	p.L285X	16	1 English	1 (1 ht)	This study
<i>Intronic mutations</i>						
c.497+4A>G	I5	p.A118RfsX10 (exon 5 skipping), p.V117_E187del (exons 5-6 skipping)	16	1 English	1 (1 ht)	This study
c.750+1G>A	I7	r.spl?	14, 15	2 Spanish	2 (2 ht)	This study
<i>Polymorphism</i>						
c.252+34C>T	I3		11	1 Palestinian	1 (1 ht)	This study
Reported before						
c.109G>T	E2	p.E37X	1, 3, 5, 6, 7, 19, 23, 2, 4, 21	7 Spanish, 1 Argentinian, 1 Moroccan, 1 Portuguese	18 (2 ht)	Pié et al. 1997
c.125A>G	E2	p.D42G	24	1 Palestinian	2	Mitchell et al. 1998
c.202_207delCT	E3	p.S69CfsX11	20	1 Spanish	2	Mitchell et al 1993
c.504_505delCT	E6	p.S169LfsX8	14, 15, 19, 22, 21	4 Spanish and 1 Portuguese	5 (5 ht)	Casals et al. 1997
c.698A>G	E7	p.H233R	17	1 English	1 (1 ht)	Roberts et al. 1996

cDNA numbering is based on reference sequence GenBank NM_000191.2; +1 corresponds to the A of the ATG initiation translation codon; ht, heterozygous; *all recombinant protein (p.E37K, p.S142F, p.C174Y, p.F192S, p.I200F) generated from these mutations, showed an activity lower than 5% respect to the wild-type (see material and methods, and results).

Table 2. Kinetic Parameters of the wild-type and mutants of human HMG-CoA lyase

Protein	Specific activity (nmol acetoacetate/ min/ mg protein)	Km (HMG-CoA, μ M)
Wild-type	50	25
p.E37K	<5%	n.d.
p.S142F	<5%	n.d.
p.C174Y	<5%	n.d.
p.F192S	<5%	n.d.
p.I200F	<5%	n.d.

Values of mutant specific activity represent percentage of wild-type values. nd: not detected

The mutation c.497+4A>G found in intron 5 of patient 16 generated an alternative splicing with 2 transcripts, one bearing a five-exon deletion and the other with deletion of exons 5 and 6. In the other intronic mutation (c.750+1G>A), the splicing study could not be performed because the patient (case 14) died. When his mother became pregnant again, we performed a prenatal study in the fetus (case15), which showed the same mutations as his brother (c.[750+1G>A] +[504_505delCT]) (case 14). In previously reported mutations, alternative splicings were confirmed, as in c.109G>T, with the variant without exon 2 and in c.504_505delCT, with the variants without exons 5 and 6 and without exon 6 (Figure 1).

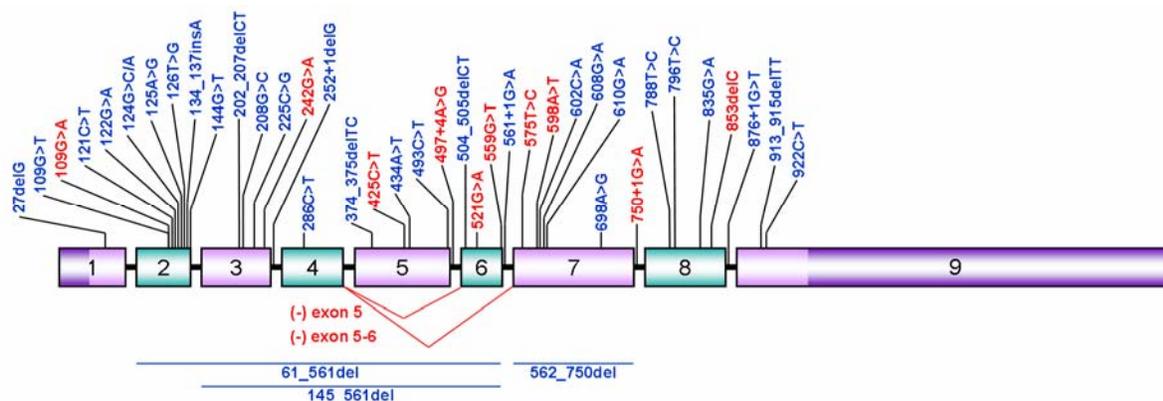


Figure 1. Scheme of the mutations located in the human *HMGCL* gene. The newly reported mutations are indicated in red.

In patients 12 and 16 the diagnosis was confirmed by genetic analysis. In the first case because he died prematurely, the mutations were identified in the parents, and the second was a prenatal diagnosis.

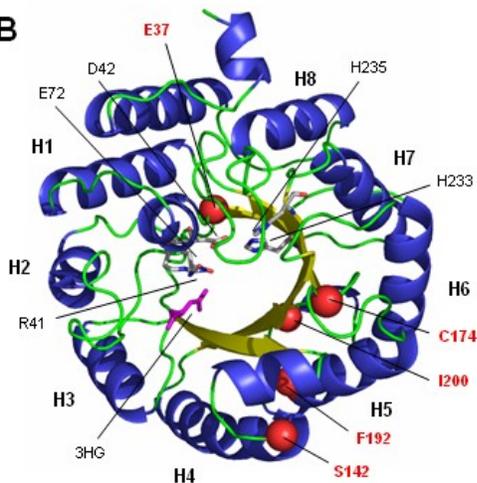
To establish the correlation between structure-function of the newly identified missense mutations, an evolutive and structural analysis was performed using the HMGCL protein sequence from several organisms (from human to bacteria) and the crystallized structure (Fu, et al., 2006) of the human enzyme (Figure 2) as references. All five mutated residues were completely conserved in the sequences analyzed (Figure 2A), with the exception of F192 (see below), which is consistent with the lack of activity of the corresponding mutant enzymes. The charged side chain of E37, located in beta strand 1, is linked through hydrogen bonds to polar residues S258 and S259, in beta strand 8, and T278, in alpha helix 8, contributing to the structural stability of the enzyme. Mutation of E37 to Lys may modify the geometry of this interaction. Due to the proximity of E37 to catalytic residues R41 and D42 (Figure 2B), such a change may disturb the arrangement of the active center. Mutation C174Y may have a similar leading to the generation of an abnormal shape of the active center. Both F192 and I200 residues are located in a hydrophobic cluster formed by residues I126, F150, V168 and V188 (Figure 2C). Although F192 is not conserved through evolution, the hydrophobic nature of the residue in the homologous position is maintained (Figure 2A), this being Leu or Met in the rest of the organisms studied. Replacing Phe by Ser in this position may reorientate the residues involved in substrate positioning. A similar mechanism, although not as dramatic as the F192S change, may explain I200F mutant malfunction, probably due to the larger shape of the newly introduced

Phe residue in the packed cluster instead of Ile. Mutation of S142 to Phe may generate a similar effect: as the side chain of S142 contacts charged residues E132, K136 and E145, the introduction of a large hydrophobic Phe aminoacid in this polar environment (Figure 2D) may disrupt the enzyme structure in the vicinity of the catalytic centre.

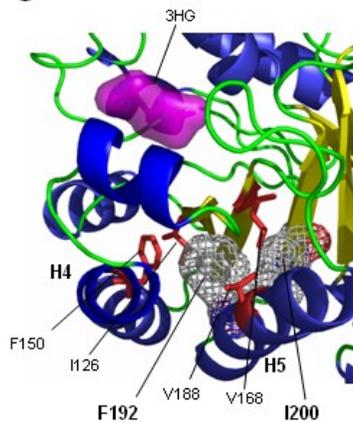
A

		●		●		●		●	●			
HMGCL_HUMAN	30	PKRVKIVEVGPRD	42	135	TKKNINCSIEESFORF	150	166	GYVSCALGCPY	176	185	VAEVTKKFYSMGCYEISLGDITG	207
HMGCL_RAT	30	PKRVKIVEVGPRD	42	135	TRKNVNCSIEESFORF	150	166	GYVSCALGCPY	176	185	VAEVARKKLYSMGCYEISLGDITG	207
HMGCL_MOUSE	30	PKQVKIVEVGPRD	42	135	TRKNANCSIEESFORF	150	166	GYVSCALGCPY	176	185	VAEVARKKLYSMGCYEISLGDITG	207
HMGCL_XENLA	33	PKEVKIVEVGPRD	45	138	SKKNINCSIDESLQRF	153	169	GYVSCVLGCPY	179	188	VAEVAYKMFSGMCYEISLGDITG	210
HMGCL_PSEMV	1	MQAVKVFVEVGPRD	13	106	SRNNINCSIDESFERF	121	137	GYVSCVLGCPF	147	156	VAKVARRLVELGCYEISLGDITG	178

B



C



D

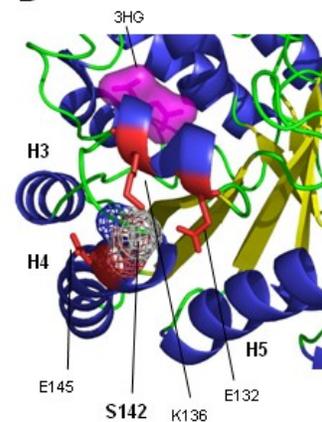


Figure 2. Structural location of missense mutations. **A.** Multiple alignment of several HMGCL protein sequences (from human; rat, mouse, *Xenopus laevis* -XENLA- and *Pseudomonas mevalonii* -PSEMV-, respectively), in the neighborhood of mutated residues E37, S142, C174, F192 and I200. **B.** 3-D structure of human 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase (PDB entry 2CW6). Position of newly reported mutations, catalytic residues R41, D42, E72, H233 and H235, as well as a molecule of co-crystallized 3-hydroxyglutaric acid (3HG), is indicated. Alpha helices in the (ab)₈ barrel structure are labeled H1 to H8. **C.** Area surrounding missense mutations F192 and I200. Location of 3HG molecule and residues in the same hydrophobic cluster (I126, F150, V168 and V188) is indicated. **D.** Location of residues in the vicinity of S142, indicating the close situation of 3HG in the catalytic center of the enzyme.

DISCUSSION

Mutational update

This article reports the genetic study of the largest and most heterogeneous cohort of patients with 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria. Previously, 34 allelic variants were characterized in 100 patients with this disease (Figure 1). Here, we analyzed 11 new variants in 24 patients, which accounts for 24% of the known allelic variants and 24% of the cases reported. Although patients are mainly of European origin (71%) and mostly Spanish (54%), we have also studied patients from different ethnic backgrounds, including for the first time Pakistani, Palestinian and Ecuadorian patients, some of whom were found to bear mutations hitherto unknown.

The mutational profile is heterogeneous with no prevalent sequence variations detected, except for 109G>T (E37X), known as Mediterranean mutation (Casale, et al., 1998), which was found in 18 of the 48 disease alleles analyzed (38%) and c.504_505delCT in 5 out of 48 (10%). These results confirm the Mediterranean mutation as the second most frequent mutation in the world (31 cases), with a specific location in the Iberian Peninsula, where

it was carried by 100% of the Portuguese patients (13 cases) (Carrasco, et al., 2007; Pié, et al., 1997) and by 61% of Spanish (11 cases) (Casale, et al., 1998; Puisac, et al., 2005). This mutation was also found in an Argentinian patient of Spanish ancestry and in one Moroccan; and since the other studied Moroccan patient carries it (Pié, et al., 1997), the Mediterranean mutation may have a high incidence in that country. The present study also demonstrates that the mutation c.504_505delCT is the third most frequent worldwide although its incidence is much lower than the first two, and it seems to be exclusively located in the Iberian Peninsula, where 15% of Portuguese (2 cases) (Cardoso, et al., 2004) and 27% of Spanish patients have it (Casals, et al., 1997). In spite of genetic similarities between the Iberian Peninsula populations, the Portuguese seem to be more homogeneous, bearing only one of these two mutations. Our results show that the Spanish have the highest known allelic variety, with 7 different mutations, 4 new and 1 previously described in Acadian French Canadian patients (c.202_207delCT) (Mitchell, et al., 1993).

Characterization of 2 English patients with 3 mutations, 2 of them new, is an advance in the study of that population, where just 2 mutations on 2 patients were known so far (Casals, et al., 2003; Wang, et al., 1996). A new mutation is described in a French patient, resulting in 6 mutations in 6 patients known in the French group (including Acadians and Cajuns) (Mitchell, et al., 1992; Mitchell, et al., 1993; Zapater, et al., 1998). Surprisingly, one of the mutations (c.125A>G) located on Palestinian patients was previously reported on a Dutch patient (Mitchell, et al., 1998). These results reinforce the hypothesis that there are 3 countries, Saudi Arabia (> 45 patients), Spain (18 patients) and Portugal (13 patients) in which a large number of cases bear the same mutations, and that the remaining countries have few patients affected by a large variety of mutations.

The prenatal study performed in a living foetus (case 15) is the third reported prenatal molecular diagnosis performed in an affected family (case 14). The first two were carried out on an Italian and a Turkish family, respectively (Koling, et al., 2000; Mitchell, et al., 1995). These studies allowed the accurate genetic counselling of those families.

Functional and structural analysis

Missense mutations were studied with *E. coli* expression of HL with plasmid pMAL-c2x-HL. However, other methods have been described in bacteria (Casals, et al., 2003; Roberts, et al., 1996) and eukaryotes (Muroi, et al., 2000). The most efficient is that based on pTrc99A vector, in which the enzyme was crystallized with 3 chromatography steps (Fu, et al., 2006; Roberts, et al., 1994). The new system proposed here has been shown to be efficient in enzymatic and directed mutagenesis studies. It is simple and it can be performed in a single chromatography step.

New mutation c.109G>A (cases 8 and 9), is located on exon 2, at the beginning of a previously suggested *hot spot* for mutations (Pié, et al., 2003) (Figure 1). In the 3-D structure of the protein, the changed aminoacid (p.E37K) is located very close to residue R41, involved in the stabilization of the intermediate enolate of the reaction, and to D42, involved in the coordination of magnesium (Fu, et al., 2006). These two residues, in addition to residues E72, H233 and H235, are located in the active center of the enzyme. The replacement of an acidic residue (Glu37) by a basic one (Lys) in the vicinity explains the total loss of activity of mutant protein in affected patients. Another two missense mutations (p.F192S and p.I200F) are located on exon 7. Four different mutations have been found in this exon, although only one, c.698A>G (p.H233R), appears to affect a residue in the active center of the enzyme. The other appear to be more related to changes in protein structure shape and stability. This high incidence of mutations in exon 7 thus suggests a new hot spot. Variations in protein structure, in positions located close to the active center, are also the most probable cause of the effects observed in enzyme activity of mutants p.S142F and p.C174Y, the latter probably also implicated in the maintenance of a disulphide bond.

Genotype-phenotype correlations

The fact that all studied missense mutations cause a loss of enzyme activity greater than 95% is consistent with other published data (Mitchell, et al., 1998; Carrasco, et al., 2007) and suggests that the illness appears only in very severe genotypes, and that partial disruption of the enzyme is probably compatible with normal function. Therefore, it is very difficult to establish genotype-phenotype correlations because we only see the effects of very severe genotypes. The expansion of neonate screening would help us to detect asymptomatic cases or mild cases with no clinical expression. We hypothesize that phenotype variations should be sought in external factors, like

those that may cause hypoglycaemia (fasting or acute illness). Clinical observations seem to support this hypothesis. On one hand, two brothers (patients 8 and 9) bearing the same mutation in homozygosis (c.109G>A) had very different evolution. One of them had an acute crisis with hypoglycaemia and lethargy and the other has not showed any symptom of the illness. On the other hand, patients with the same mutation in homozygosis (c.109G>T) sometimes presented low to moderate symptoms, such as fever or mild hypoglycaemia (cases 1 and 2), or more severe symptoms that were life-threatening (case 6). Therefore, it is very important to avoid situations that might induce hypoglycaemia in these patients.

REFERENCES

- Al-Sayed M, Imtiaz F, Alsmadi OA, Rashed MS, Meyer BF. 2006. Mutations underlying 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase deficiency in the Saudi population. *BMC Med Genet* 7:86.
- Altschul SF, Lipman DJ. 1990. Protein database searches for multiple alignments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(14):5509-13.
- Bolhuis PA, Page-Christiaens GC. 2005. [The advisory report 'Neonatal screening' from the Health Council of the Netherlands]. *Ned Tijdschr Geneesk* 149(51):2857-60.
- Cardoso ML, Rodrigues MR, Leao E, Martins E, Diogo L, Rodrigues E, García P, Rolland MO, Vilarinho L. 2004. The E37X is a common HMGCL mutation in Portuguese patients with 3-hydroxy-3-methylglutaric CoA lyase deficiency. *Mol Genet Metab* 82(4):334-8.
- Carrasco P, Menao S, López-Viñas E, Santpere G, Clotet J, Sierra AY, Gratacós E, Puisac B, Gómez-Puertas P, Hegardt FG, Pié J, Casals N. 2007. C-terminal end and aminoacid Lys48 in HMG-CoA lyase are involved in substrate binding and enzyme activity. *Mol Genet Metab* 91(2):120-7.
- Casale CH, Casals N, Pié J, Zapater N, Pérez-Cerda C, Merinero B, Martínez-Pardo M, García-Penas JJ, García-Gonzalez JM, Lama R, Poll-The B-T, Smeitink JAM, Wanders RJ, Ugarte M, Hegardt FG. 1998. A nonsense mutation in the exon 2 of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A lyase (HL) gene producing three mature mRNAs is the main cause of 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria in European Mediterranean patients. *Arch Biochem Biophys* 349(1):129-37.
- Casals N, Gómez-Puertas P, Pié J, Mir C, Roca R, Puisac B, Aledo R, Clotet J, Menao S, Serra D, Asins G, Till J, Elias-Jones AC, Cresto JC, Chamoles NA, Abdenur JE, Mayatepek E, Besley G, Valencia A, Hegardt FG. 2003. Structural (betaalpha)8 TIM barrel model of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase. *J Biol Chem* 278(31):29016-23.
- Casals N, Pié J, Casale CH, Zapater N, Ribes A, Castro-Gago M, Rodriguez-Segade S, Wanders RJ, Hegardt FG. 1997. A two-base deletion in exon 6 of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A lyase (HL) gene producing the skipping of exons 5 and 6 determines 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria. *J Lipid Res* 38(11):2303-13.
- Faull KF, Bolton PD, Halpern B, Hammond J, Danks DM. 1976. The urinary organic acid profile associated with 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria. *Clin Chim Acta* 73(3):553-9.
- Fu Z, Runquist JA, Forouhar F, Hussain M, Hunt JF, Mizioroko HM, Kim JJ. 2006. Crystal structure of human 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Lyase: insights into catalysis and the molecular basis for hydroxymethylglutaric aciduria. *J Biol Chem* 281(11):7526-32.
- Hruz PW, Mizioroko HM. 1992. Avian 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase: sensitivity of enzyme activity to thiol/disulfide exchange and identification of proximal reactive cysteines. *Protein Sci* 1(9):1144-53.
- Koling S, Kalhoff H, Schauerte P, Lehnert W, Diekmann L. 2000. [3-hydroxy-3-methylglutaraciduria (case report of a female Turkish sisters with 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A lyase deficiency)]. *Klin Padiatr* 212(3):113-6.
- Mitchell G, Robert M, Fontaine G, Wang S, Lambert M, Cole D, Lee C, Gibson M, Mizioroko HM. 1992. HMG CoA lyase (HL) deficiency: detection of a causal mutation in an affected French-Canadian sibship. *Am J Hum Genet* 51 (suppl).
- Mitchell GA, Jakobs C, Gibson KM, Robert MF, Burlina A, Dionisi-Vici C, Dallaire L. 1995. Molecular prenatal diagnosis of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase deficiency. *Prenat Diagn* 15(8):725-9.

- Mitchell GA, Ozand PT, Robert MF, Ashmarina L, Roberts J, Gibson KM, Wanders RJ, Wang S, Chevalier I, Plöchl E, Mizioroko HM. 1998. HMG CoA lyase deficiency: identification of five causal point mutations in codons 41 and 42, including a frequent Saudi Arabian mutation, R41Q. *Am J Hum Genet* 62(2):295-300.
- Mitchell GA, Robert MF, Hruz PW, Wang S, Fontaine G, Behnke CE, Mende-Mueller LM, Schappert K, Lee C, Gibson KM, Mizioroko HM. 1993. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A lyase (HL). Cloning of human and chicken liver HL cDNAs and characterization of a mutation causing human HL deficiency. *J Biol Chem* 268(6):4376-81.
- Muroi J, Yorifuji T, Uematsu A, Nakahata T. 2000. Cerebral infarction and pancreatitis: possible complications of patients with 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency. *J Inher Metab Dis* 23(6):636-7.
- Pié J, Casals N, Casale CH, Buesa C, Mascaro C, Barcelo A, Rolland MO, Zobot T, Haro D, Eyskens F, Divry P, Hegardt FG. 1997. A nonsense mutation in the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase gene produces exon skipping in two patients of different origin with 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency. *Biochem J* 323 (Pt 2):329-35.
- Pié J, Casals N, Puisac B, Hegardt FG. 2003. Molecular basis of 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria. *J Physiol Biochem* 59(4):311-21.
- Pié J, López-Viñas E, Puisac B, Menao S, Pié A, Casale C, Ramos FJ, Hegardt FG, Gómez-Puertas P, Casals N. 2007. Molecular genetics of HMG-CoA lyase deficiency. *Mol Genet Metab* 92(3):198-209.
- Puisac B, López-Viñas E, Moreno S, Mir C, Pérez-Cerda C, Menao S, Lluch D, Pié A, Gómez-Puertas P, Casals N, Ugarte M, Hegardt FG, Pié J. 2005. Skipping of exon 2 and exons 2 plus 3 of HMG-CoA lyase (HL) gene produces the loss of beta sheets 1 and 2 in the recently proposed (beta-alpha)8 TIM barrel model of HL. *Biophys Chem* 115(2-3):241-5.
- Roberts JR, Mitchell GA, Mizioroko HM. 1996. Modeling of a mutation responsible for human 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency implicates histidine 233 as an active site residue. *J Biol Chem* 271(40):24604-9.
- Roberts JR, Narasimhan C, Hruz PW, Mitchell GA, Mizioroko HM. 1994. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase: expression and isolation of the recombinant human enzyme and investigation of a mechanism for regulation of enzyme activity. *J Biol Chem* 269(27):17841-6.
- Sweetman L, Williams JC. 2001. Branched chain organic acidurias. New York: McGraw-Hill.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22(22):4673-80.
- Vargas CR, Sitta A, Schmitt G, Ferreira GC, Cardoso ML, Coelho D, Gibson KM, Wajner M. 2007. Incidence of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase (HL) deficiency in Brazil, South America. *J Inher Metab Dis*.
- Wanders RJ, Schutgens RB, Zoeters BH. 1988. Prenatal diagnosis of 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria via enzyme activity measurements in chorionic villi, chorionic villous fibroblasts or amniocytes using a simple spectrophotometric method. *J Inher Metab Dis* 11(4):430.
- Wang SP, Robert MF, Gibson KM, Wanders RJ, Mitchell GA. 1996. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase (HL): mouse and human HL gene (HMGCL) cloning and detection of large gene deletions in two unrelated HL-deficient patients. *Genomics* 33(1):99-104.
- Watson MS, Mann MY, Lloyd-Puryear MA, Rinaldo M. 2006. Newborn screening: toward a uniform screening panel and system. *Genet Med* 8 Suppl 1:1S-252S.
- Wildeman M, van Ophuizen E, den Dunnen JT, Taschner PEM. 2008. Improving sequence variant descriptions in mutation databases and literature using the Mutalyzer sequence variation nomenclature checker. *Hum Mutat* 29(1):6-13.
- Zafeiriou DI, Vargiami E, Mayapetek E, Augoustidou-Savvopoulou P, Mitchell GA. 2007. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a lyase deficiency with reversible white matter changes after treatment. *Pediatr Neurol* 37(1):47-50.
- Zapater N, Pié J, Lloberas J, Rolland MO, Leroux B, Vidailhet M, Divry P, Hegardt FG, Casals N. 1998. Two missense point mutations in different alleles in the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A lyase gene produce 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria in a French patient. *Arch Biochem Biophys* 358(2):197-203.

Differential HMG-CoA lyase expression in human tissues provides clues about 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria

Beatriz Puisac · María Arnedo · Cesar H. Casale · María Pilar Ribate · Tomás Castiella · Feliciano J. Ramos · Antonia Ribes · Celia Pérez-Cerdá · Nuria Casals · Fausto G. Hegardt · Juan Pié

Received: 29 December 2009 / Revised: 30 March 2010 / Accepted: 1 April 2010 / Published online: 8 June 2010
© The Author(s) 2010

Abstract 3-Hydroxy-3-methylglutaric aciduria is a rare human autosomal recessive disorder caused by deficiency of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase (HL). This mitochondrial enzyme catalyzes the common final step of leucine degradation and ketogenesis. Acute symptoms include vomiting, seizures and lethargy, accompanied by metabolic acidosis and hypoketotic hypoglycaemia. Such organs as the liver, brain, pancreas, and heart can also be involved. However, the pathophysiology of this disease is only partially understood. We measured mRNA levels, protein expression and enzyme activity of human HMG-CoA lyase from liver, kidney, pancreas, testis, heart,

skeletal muscle, and brain. Surprisingly, the pancreas is, after the liver, the tissue with most HL activity. However, in heart and adult brain, HL activity was not detected in the mitochondrial fraction. These findings contribute to our understanding of the enzyme function and the consequences of its deficiency and suggest the need for assessment of pancreatic damage in these patients.

Abbreviations

HMG-CoA 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA
HL HMG-CoA lyase

Communicated by: K. Michael Gibson

Competing interest: None declared.

B. Puisac · M. Arnedo · M. P. Ribate · F. J. Ramos · J. Pié (✉)
Laboratory of Clinical Genetics and Functional Genomics,
Department of Pharmacology and Physiology,
School of Medicine, University of Zaragoza,
C/ Domingo Miral s/n,
50009 Zaragoza, Spain
e-mail: juanpie@unizar.es

C. H. Casale
Department of Molecular Biology,
National University of Rio Cuarto,
5800 Rio Cuarto, Cordoba, Argentina

T. Castiella
Department of Pathology, School of Medicine,
University of Zaragoza,
50009 Zaragoza, Spain

A. Ribes
Division of Inborn Errors of Metabolism (IBC),
Department of Biochemistry and Molecular Genetics,
Hospital Clinic and CIBERER,
08036 Barcelona, Spain

C. Pérez-Cerdá
Department of Molecular Biology,
Molecular Biological Center Severo Ochoa CSIC-UAM,
University Autonoma of Madrid, CIBERER,
28049 Madrid, Spain

N. Casals
Department of Biochemistry and Molecular Biology,
School of Health Sciences,
International University of Catalonia,
08190 Sant Cugat, Barcelona, Spain

F. G. Hegardt
Department of Biochemistry and Molecular Biology,
School of Pharmacy, University of Barcelona,
08028 Barcelona, Spain

N. Casals · F. G. Hegardt
CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN),
Instituto de la Salud Carlos III,
28029 Madrid, Spain

Introduction

3-Hydroxy-3-methylglutaric aciduria (MIM 246450) is a rare human autosomal recessive disorder caused by deficiency of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase (HMG-CoA lyase, HL, EC 4.1.3.4) (Faull et al. 1976). This mitochondrial enzyme catalyzes the cleavage of HMG-CoA to form acetyl-CoA and acetoacetate, which is the common final step in leucine degradation and ketogenesis.

The disease usually appears in the first year of life after a fasting period or during intercurrent illness. Acute symptoms include vomiting, seizures and lethargy, accompanied by metabolic acidosis, hypoketotic hypoglycaemia and a characteristic pattern of elevated urinary organic acid metabolites (Gibson et al. 1988; Schutgens et al. 1979; Wysocki and Hahnel 1986). Such organs as the liver and brain are frequently affected, and occasionally the pancreas and heart can also be involved (Gibson et al. 1994; Leung et al. 2009; Muroi et al. 2000; Urganci et al. 2001; Wilson et al. 1984; Zafeiriou et al. 2007; Zoghbi et al. 1986).

The pathophysiology of this disease is only partially understood. It may be explained by the deficit of an alternative energy source (ketone bodies), the intracellular accumulation of toxic organic acids or fatty acids or secondary carnitine deficiency (Kahler et al. 1994; Mitchell et al. 1995; Leung et al. 2009). However, these interpretations were not based on a thorough understanding of the expression or activity of HL in the affected tissues. To our knowledge, HL has been examined only in liver, leukocytes and fibroblasts (Ashmarina et al. 1994; Wysocki and Hahnel 1976a; Wysocki and Hahnel 1976b) but not in other human tissues. This report is the first study of mRNA levels, protein expression and enzyme activity of human HMG-CoA lyase in kidney, pancreas, testis, heart, skeletal muscle, and brain. The results may improve our understanding of the enzyme function and the involvement of these organs in 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria.

Materials and methods

HL mRNA

HL mRNA was measured in Multiple Tissue cDNA (MTC) panels (Clontech) by a Real-Time quantitative PCR method using a TaqMan Gene Expression Assay (Assay HMGCL: Hs00609306_m1 Assay GAPDH:Hs99999905_m1) (Applied Biosystems). The levels of HL mRNA was calculated relative to the *GAPDH* control by the $\Delta\Delta C_t$ method. The level of expression HL in skeletal muscle was arbitrarily taken as the calibrator to normalize the other tissues.

HL protein analysis

Human tissues: liver, kidney, pancreas, testis, heart, skeletal muscle, and brain were obtained within 10–12 h post mortem at autopsy from two male subjects at the Department of Pathology of our University. They were 65 and 70 years old, and representative samples of organs of approximately 1–2 g were taken from each subject. To minimize protein degradation, the bodies were kept at 4°C until autopsy and all the tissues were immediately shock-frozen in N₂ and stored at –80°C until use.

To isolate the mitochondrial fraction from human tissues, we performed subcellular separation as described by Clinkenbeard et al. (1975). Mitochondrial proteins separated on a 15% SDS-PAGE were transferred to a 0.45- μ M nitrocellulose membrane by transfer blot. The membranes were probed with a mouse monoclonal antibody against HL (Abnova) (1:1,000 dilution) and revealed with the kit SuperSignal West Dura Extended Duration substrate (Thermo Scientific) using a peroxidase-conjugated secondary anti-mouse antibody (Sigma, 1:1,000). The protein bands were quantified using Scion ImageJ v1.39u software (Scion) and normalized to micrograms of total protein obtained from 10 mg of tissue. The density of the band corresponding to the liver was taken as 100%.

HL activity

After subcellular separation, 20 μ l of mitochondrial fraction of different tissues (about 200 μ g of protein) was used to measure enzymatic activity. HMG-CoA lyase activity was assayed by the spectrophotometric assay described by Wanders et al. (1988), which measures the amounts of acetoacetate produced. The level of activity was expressed as mU/g wet weight tissue (one milliunit equals 1 nmol of substrate converted/min).

PAP measurements

Serum samples were collected in acute and inter-crisis periods from 15 patients with 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria and stored at –20°C. All patients were diagnosed biochemically, and most of them were also diagnosed genetically (Table 1). Human serum PAP (pancreatitis associated protein) concentration was determined in control and patients by a kit based on a sandwich immunoenzymatic system (PancrePAP, Dynabio).

Results

HL mRNA was detected in all the tissues studied, albeit in widely differing amounts. Tissues with the highest expres-

Table 1 Diagnostic parameters and pancreatitis associated protein (PAP) measurements in patients with 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria

Case	Organic acids	<i>HMGCL</i> mutation	PAP (ng/mL)	Reference
P1	+	c.109G>T	6.72	Casale et al. 1998
P2	+	c.109G>T	8.49	Casale et al. 1998
P3	+	c.109G>T/c504_5delCT	20.12 ^a 31.87	Menao et al. 2009
P4	+	c.144G>T/c.504_5delCT	5.61	Menao et al. 2009
P5	+	c.202_207delCT	9.42	Menao et al. 2009
P6	+	c.575T>C	6.17	Menao et al. 2009
P7	+	c.109G>T	5.39	Menao et al. 2009
P8	+	c.109G>T	7.85	Menao et al. 2009
P9	+	c.109G>T/c.825C>G	5.80 ^a 7.37	—
P10	+	c.109G>T	2.13 ^a	Menao et al. 2009
P11	+	c.109G>T/c.504_5delCT	5.35 ^a	—
P12	+	c.242G>A	5.93 ^a	—
P13	+	—	13.63	—
P14	+	—	26.92 ^a 10.46	—
P15	+	—	6.16	—

PAP values in controls (17.46±8.27 ng/ml, mean±SD, n=11)

+ Elevated organic acids (3-hydroxy-3-methylglutaric, 3-methylglutaconic, 3-methylglutaric and 3-hydroxy-isovaleric); — no data; PAP values measured in periods intercrisis and

^a in acute crisis. PAP values < 50 ng/mL are considered normal

sion or controversial ketogenic capacity are reported in Fig. 1a: [liver 112.2 arbitrary units (100%) pancreas 43.5 (39%), kidney 17.56 (16%), testis 26.81 (24%), heart 2.96 (2,6%), brain 2.26 (2%), and skeletal muscle 1 (0.89%)]. The highest protein levels were found in human liver (100%), followed by pancreas (89%), testis (60%), kidney (42%), and skeletal muscle (36%); a weak signal was detected in heart (2%) and brain (1.8%) (Fig. 1b). The enzyme activity was measured in the mitochondrial fraction. The liver had the highest activity (128.86 mU/g of wet weight tissue, 100%), followed by pancreas (58.49 mU/g, 45%), kidney (42.48 mU/g, 33%), testis (20.23 mU/g, 16%), and skeletal muscle (12.6 mU/g, 9,7%). HL enzyme activity was not detected in heart or brain (Fig. 1c).

The values of PAP in patients varied between 5.31–31.87 ng/mL (Table 1) within a normal range (<50 ng/mL) (Desjeux et al. 2002). Simultaneously, we also measured PAP protein in 11 normal subjects as controls, and no differences (range 6.12–32.61 ng/mL) were found.

Discussion

This is the first time that a complete study of mRNA, protein and enzymatic activity of HL has been reported in a broad range of human tissues. The findings on the expression level and enzymatic activity of HL in these tissues may help us to understand the pathophysiology of HL deficiency.

Our results show that the liver has the highest HL activity, followed by pancreas. Both organs showed high

levels of mRNA, protein and HL enzyme activity. The liver is the organ most frequently affected in this deficiency, although involvement is usually mild, with elevated transaminases and hepatomegaly (Urganci et al. 2001; Wysocki and Hahnel 1986). Since the liver does not use ketone bodies as a source of energy (Robinson and Williamson 1980), its deficit is not the cause of the disease. However, ketogenesis is more active in the liver and the blockage of this pathway could result in an accumulation of toxic intermediate metabolites. Recently, Leipnitz et al. (2009) have demonstrated in vitro the oxidative stress caused in the liver by the accumulation of organic acids in this deficiency.

Pancreatitis is a potential complication in patients with organic acidemias, especially methylmalonic and isovaleric (Kahler et al. 1994) and less frequently in 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria (Muroi et al. 2000; Wilson et al. 1984). The presence of HL protein in pancreas has been reported (MacDonald et al. 2007), but here we demonstrate that the pancreas has the highest enzymatic activity after the liver. This finding indicates that the pancreas has a high ketogenic capacity and suggests that, if ketone bodies regulate the release of insulin (Biden and Taylor 1983; Malaisse et al. 1990; Rhodes et al. 1985), some of them could be produced in the pancreas. In contrast, ketone bodies do not seem to play an important role as energy source in this organ. The finding of higher enzymatic activity in pancreas indicates that it may be more susceptible to toxic accumulation of metabolites. This hypothesis has been proposed to explain the pathogenesis of other organic acidemias of leucine catabolism (Gut et al.

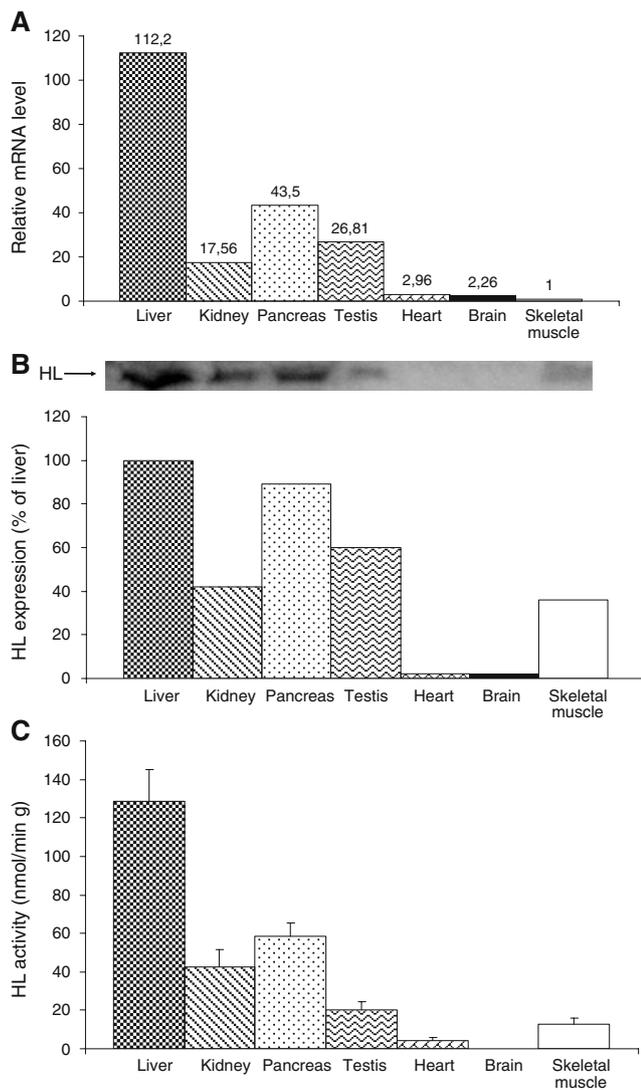


Fig 1 Comparative analysis of mRNA levels, protein expression and enzymatic activity of HMG-CoA lyase in different human tissues. **a** Relative levels of mRNA HL expression in human tissues were measured by the $\Delta\Delta CT$ method with *GAPDH* as control. The expression levels of mRNA HL in skeletal muscle were arbitrarily taken as the calibrator for all calculations, and all other tissues were normalized accordingly. The values given are the average of four measures, two from each subject. **b** HL protein expression was measured in mitochondrial fraction from human tissues. Four tissue samples were measured, two from each subject. The image shows a representative immunoblot from HL in different tissues. **c** HL activity was measured in the mitochondrial fraction of human tissues spectrophotometrically. Data are presented as mean \pm SEM ($n=4$). Four tissue samples were measured, two from each subject

1995; Kahler et al. 1994). The possibility of a progressive deterioration of the pancreas, without evident clinical manifestations, led us to study the protein PAP in patients with 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria, in order to detect and prevent any possible pancreas damage. PAP is a more

sensitive marker of pancreatitis than amylase, whose levels remain high even in absence of symptoms (Kempainen et al. 1996). The serum studies from patients in different situations of crisis and between crises did not show pathologic elevations. However, the higher activity of HL enzyme and the severity of the complications support the need to monitor the pancreatic function in patients with HL deficiency.

This study shows that, at different levels of mRNA, protein and enzymatic activity, HL is not found in the mitochondria from human brain. The absence of lyase activity in brain mitochondria is consistent with results obtained by McGarry and Foster (1969) and Bachhawat et al. (1955) in rat but it disagrees with the results of Shah (1982). Ketogenic activity by astrocytes has been described (Auestad et al. 1991; Guzmán and Blázquez 2004), but Auestad et al. (1991) have demonstrated that acetoacetate is mainly formed in astrocytes by deacylation of acetoacetyl-CoA and not by the action of the mitochondrial HMG-CoA cycle. In conclusion, despite the difficulties of studying the human brain immediately after death to avoid protein degradation, HL activity in mitochondria from adult human brain, if present, would be minimal. We suggest that the neurological alterations, frequently associated with this deficiency, are related to hypoglycaemia and to the absence of the only alternative substrate to glucose for the brain ketone bodies. Concomitantly, our results show that the organic acids would not be produced in situ, although they could cross the blood–brain barrier of an immature brain (Wajner et al. 2004) and cause damage.

Dilated cardiomyopathy has been described in two patients with 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria, one young male (Gibson et al. 1994) and one adult (Leung et al. 2009). In this last case, the authors suggest that the cardiomyopathy results from impaired ketogenesis, intracellular fatty acid accumulation and a secondary carnitine deficiency. However, we found very little HL in heart tissue, from which we conclude that it does not regulate the entry of fatty acids to the heart and thus prevent their accumulation. Therefore, our results do not support the hypothesis of local accumulation of organic acids as a cause of the cardiomyopathy. In HL deficiency, heart disease could be caused by the lack of an alternative energy substrate. The heart is a continuously active muscle which uses various energy substrates depending on their availability (Kodde et al. 2007). Although ketone bodies are not an indispensable substrate, the added L-carnitine deficiency, which is caused by the HL deficiency, could alter the transport of fatty acids to the mitochondria for oxidation and the coupling between glycolysis and glucose oxidation (Allard et al. 2006). L-carnitine supplementation has been recommended for patients with organic acidurias to allow

the elimination of toxic acids (Chalmers et al. 1984), but it could also improve the heart function.

In HL deficiency, alterations in other organs such as kidney, testis and skeletal muscle have not been reported, although in our study the enzymatic activity in kidney was high or moderately high in testis and skeletal muscle. Surprisingly, in muscle, although the mRNA levels were very low, moderate HL activity was measured. Similar cases are reported in the literature (Lewin et al. 2001), which suggests that certain tissues may have a lower turnover of the HL protein versus an unstable mRNA. In testis, the low activity levels of HL compared with the high enzyme expression suggest that HL activity could be regulated after translation in this tissue. All these tissues use the ketone bodies as an alternative energy source, but they do not show strong dependence on them (Robinson and Williamson 1980). Moreover, they are less sensitive to the accumulation of toxic metabolites, in contrast to the brain (Wajner et al. 2004) or pancreas (Leung and Chan 2009).

The results reported here help us to understand the enzyme function and pathophysiology of the 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria. We suggest that pancreatitis should be included as a possible complication to seek in patients with HL deficiency, especially during acute episodes. Moreover, the addition of nutritional factors, such as L-carnitine, can be essential to prevent the development of cardiomyopathy.

Acknowledgements This study was supported by grants from: Diputación General de Aragón (Ref. Grupo Consolidado B20) and (Ref. PI128/08); Spanish Ministry of Education and Science (Ref. SAF2004-06843-C03); the Ajut de Suport als Grups de Recerca de Catalunya (Ref. 2005SGR-00733). CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III, Spain.

References

- Allard ML, Jeejeebhoy KN, Sole MJ (2006) The management of conditioned nutritional requirements in heart failure. *Heart Fail Rev* 11:75–82
- Ashmarina LI, Rusnak N, Miziorko HM et al (1994) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase is present in mouse and human liver peroxisomes. *J Biol Chem* 269:31929–31932
- Auestad N, Korsak RA, Morrow JW et al (1991) Fatty acid oxidation and ketogenesis by astrocytes in primary culture. *J Neurochem* 56:1376–1386
- Bachhawat BK, Robinson WG, Coon MJ (1955) The enzymatic cleavage of beta-hydroxy-beta-methylglutaryl coenzyme A to acetoacetate and acetyl coenzyme A. *J Biol Chem* 216:727–736
- Biden TJ, Taylor KW (1983) Effects of ketone bodies on insulin release and islet-cell metabolism in the rat. *Biochem J* 212:371–377
- Casale CH, Casals N, Pié J et al (1998) A nonsense mutation in the exon 2 of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A lyase (HL) gene producing three mature mRNAs is the main cause of 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria in European Mediterranean patients. *Arch Biochem Biophys* 349:129–137
- Clinkenbeard KD, Reed WD, Mooney RA et al (1975) Intracellular localization of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A cycle enzymes in liver. Separate cytoplasmic and mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A generating systems for cholesterologenesis and ketogenesis. *J Biol Chem* 250:3108–3116
- Chalmers RA, Roe CR, Stacey TE et al (1984) Urinary excretion of l-carnitine and acylcarnitines by patients with disorders of organic acid metabolism: evidence for secondary insufficiency of l-carnitine. *Pediatr Res* 18:1325–1328
- Desjeux A, Barthet M, Barthelémy S et al (2002) Serum measurements of pancreatitis associated protein in active Crohn's disease with ileal location. *Gastroenterol Clin Biol* 26:23–28
- Faull KF, Bolton PD, Halpern B et al (1976) The urinary organic acid profile associated with 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria. *Clin Chim Acta* 73:553–559
- Gibson KM, Breuer J, Nyhan WL (1988) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase deficiency: review of 18 reported patients. *Eur J Pediatr* 148:180–186
- Gibson KM, Cassidy SB, Seaver LH et al (1994) Fatal cardiomyopathy associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 17:291–294
- Gut A, Chaloner C, Schofield D et al (1995) Evidence of toxic metabolite stress in black South Africans with chronic pancreatitis. *Clin Chim Acta* 236:145–153
- Guzman M, Blazquez C (2004) Ketone body synthesis in the brain: possible neuroprotective effects. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 70:287–292
- Kahler SG, Sherwood WG, Woolf D et al (1994) Pancreatitis in patients with organic acidemias. *J Pediatr* 124:239–243
- Kemppainen E, Sand J, Puolakainen P et al (1996) Pancreatitis associated protein as an early marker of acute pancreatitis. *Gut* 39:675–678
- Kodde IF, van der Stok J, Smolenski RT et al (2007) Metabolic and genetic regulation of cardiac energy substrate preference. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 146:26–39
- Leipnitz G, Seminotti B, Fernandes CG et al (2009) Striatum is more vulnerable to oxidative damage induced by the metabolites accumulating in 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency as compared to liver. *Int J Dev Neurosci* 27:351–356
- Leung PS, Chan YC (2009) Role of oxidative stress in pancreatic inflammation. *Antioxid Redox Signal* 11:135–165
- Leung AA, Chan AK, Ezekowitz JA, et al (2009). A case of dilated cardiomyopathy associated with 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A (HMG CoA) lyase deficiency. *Case Report Med.* 183125.
- Lewin TM, Granger DA, Kim JH et al (2001) Regulation of mitochondrial sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase activity: response to feeding status is unique in various rat tissues and is discordant with protein expression. *Arch Biochem Biophys* 396:119–127
- MacDonald MJ, Smith AD 3rd, Hasan NM et al (2007) Feasibility of pathways for transfer of acyl groups from mitochondria to the cytosol to form short chain acyl-CoAs in the pancreatic beta cell. *J Biol Chem* 282:30596–30606
- Malaisse WJ, Lebrun P, Rasschaert J et al (1990) Ketone bodies and islet function: 86Rb handling and metabolic data. *Am J Physiol* 259:E123–E130
- McGarry JD, Foster DW (1969) Ketogenesis and cholesterol synthesis in normal and neoplastic tissues of the rat. *J Biol Chem* 244:4251–4256
- Menao S, López-Viñas E, Mir C et al (2009) Ten novel HMGCL mutations in 24 patients of different origin with 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria. *Hum Mutat* 30:520–529

- Mitchell GA, Kassovska-Bratinova S, Boukaftane Y et al (1995) Medical aspects of ketone body metabolism. *Clin Invest Med* 18:193–216
- Muroi J, Yorifuji T, Uematsu A et al (2000) Cerebral infarction and pancreatitis: possible complications of patients with 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 23:636–637
- Robinson AM, Williamson DH (1980) Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues. *Physiol Rev* 60:143–187
- Rhodes CJ, Campbell IL, Szopa TM et al (1985) Effects of glucose and D-3-hydroxybutyrate on human pancreatic islet cell function. *Clin Sci* 68:567–572
- Schutgens RB, Heymans H, Ketel A et al (1979) Lethal hypoglycemia in a child with a deficiency of 3-hydroxy-3-methylglutarylcoenzyme A lyase. *J Pediatr* 94:89–91
- Shah SN (1982) Cytosolic 3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme a synthase in rat brain: properties and developmental change. *Neurochem Res* 7:1359–1366
- Urganci N, Arapoglu M, Evruke M et al (2001) A rare cause of hepatomegaly: 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-a lyase deficiency. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 33:339–341
- Wajner M, Latini A, Wyse AT et al (2004) The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: insights from animal studies. *J Inherit Metab Dis* 27:427–448
- Wanders RJ, Schutgens RB, Zoeters PH (1988) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase in human skin fibroblasts: study of its properties and deficient activity in 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria patients using a simple spectrophotometric method. *Clin Chim Acta* 171:95–101
- Wilson WG, Cass MB, Sovik O et al (1984) A child with acute pancreatitis and recurrent hypoglycemia due to 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency. *Eur J Pediatr* 142:289–291
- Wysocki SJ, Hahnel R (1976a) 3-Hydroxy-3-methylglutaric aciduria: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase levels in leucocytes. *Clin Chim Acta* 73:373–375
- Wysocki SJ, Hahnel R (1976b) 3-Hydroxy-3-methylglutaric aciduria: deficiency of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A lyase. *Clin Chim Acta* 71:349–351
- Wysocki SJ, Hahnel R (1986) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a lyase deficiency: a review. *J Inherit Metab Dis* 9:225–233
- Zafeiriou DI, Vargiami E, Mayapetek E et al (2007) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a lyase deficiency with reversible white matter changes after treatment. *Pediatr Neurol* 37:47–50
- Zoghbi HY, Spence JE, Beaudet AL et al (1986) Atypical presentation and neuropathological studies in 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency. *Ann Neurol* 20:367–369



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