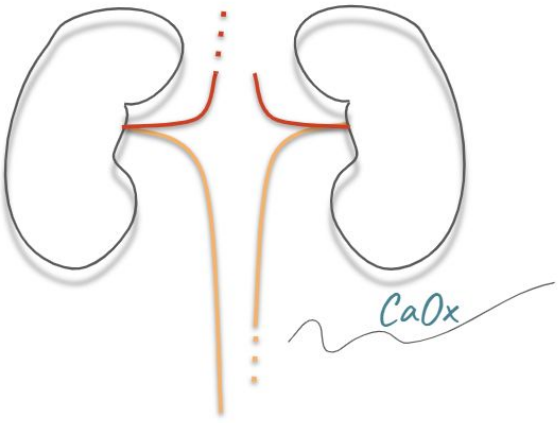
Análisis funcional de las modificaciones postraduccionales de AGT, enzima responsable de la hiperoxaluria primaria



- Autor: Nicole Fontana García
- Tutor: Eduardo Salido Ruiz
- Departamento de Ciencias Médicas Básicas, Servicio de Anatomía Patológica, HUC.
- Universidad de La Laguna

- Índice -

Resumen 2

Abstract 3

Palabras clave 3

Introducción 3

Clínica 4

Pronóstico y tratamiento 5

AGXT y AGT 6

Justificación del trabajo 10

Hipótesis de trabajo 12

Objetivos 14

Material y métodos 14

Resultados 18

Inmunofluorescencia 19

Western Blot 22

Discusión 27

Conclusiones 30

¿Qué he aprendido durante este TFG? 31

Bibliografía 31

Documentación adicional 34

Resumen

La hiperoxaluria primaria tipo 1 (PH1) es una enfermedad rara de herencia autosómica recesiva debida a mutaciones en el gen AGXT, que produce pérdida de función renal en edades tempranas e importante morbimortalidad. La mayoría de las mutaciones causales conllevan cambios de aminoácido asociados a mal plegamiento proteico. Se han investigado poco las consecuencias de modificaciones postraduccionales de la enzima AGT, por lo que para este trabajo nos hemos propuesto estudiar el papel de la fosforilación en los residuos T9 y S81; y de la acetilación en K209 y K389. En ellos, introduciremos mutaciones que los convierten en no fosforilables (T9A, S81A) o no acetilables (K209R, K389R), así como mutaciones fosfomiméticas (T9E, S81D) o acetilomiméticas (K209Q, K389Q), y todo ello en 4 contextos diferentes: Wild-type (A), LM, LRM y LTM. Estudiaremos las consecuencias sobre la expresión proteica y localización subcelular en células de mamífero en cultivo.

Abstract

Primary hyperoxaluria type 1 is an autosomal recessive rare disease caused by AGXT mutations that leads to loss of renal function at early stages and a significant morbidity and mortality. Most mutations are missense mutations related to protein misfolding. It has been poorly studied the consequences of post-translational modifications, so that our goal is to study the role of phosphorylation on residues T9 and 81S as well as acetylation on amino acids K209 and K389. We will introduce missense mutations in order to prevent their phosphorylation (T9A, S81A) or acetylation (K209R, K389R); in addition to phosphomimetic (T9E, S81D) or acetylomimetic mutations (K209Q, K389Q), within 4 different scenarios: Wild-type (A), LM, LRM and LTM. We will study the consequences on the protein expression and subcellular location on a mammalian cell culture system.

Palabras clave

Hiperoxaluria Primaria; AGXT/AGT; Fosforilación; Acetilación; Oxalato.

Introducción

La hiperoxaluria primaria es una enfermedad rara, monogénica, de herencia autosómica recesiva, que engloba a un grupo de alteraciones congénitas en el metabolismo del glioxilato y que lleva a un aumento de producción de oxalato por parte del hígado, con consecuencias clínicas de afectación principalmente renales, aunque también con repercusión sistémica[1]. De entre los tres tipos existentes de hiperoxaluria primaria, este trabajo se centra en la tipo 1 (PH1), resultado de la pérdida de función de la enzima glioxilato aminotransferasa (AGT), codificada por el gen AGXT. Los otros dos tipos de hiperoxaluria son la tipo 2, con alteraciones en la enzima glioxilato reductasa/hidroxipiruvato reductasa (GR/HPR); y la tipo 3, con afectación de la 4-hidroxi-2-oxoglutarato aldolasa (HOGA).

Clínica

La enzima implicada en la patogénesis de esta enfermedad es la AGT, que en condiciones normales cataliza, en los peroxisomas de los hepatocitos, el paso de glioxilato a glicina. En la PH1, al estar alterada su función por diferentes mecanismos que serán comentados en apartados posteriores, dicha reacción no se lleva a cabo y el glioxilato es convertido, por la lactato deshidrogenasa (LDH), en oxalato, para el que no existe ruta metabólica ni función biológica en mamíferos[2]. Se genera, por tanto, un exceso de los niveles de oxalato, que es excretado por el sistema urinario donde se forman cristales de oxalato cálcico, insolubles y, por tanto, causantes de la clínica principal del paciente, esto es, una situación de urolitiasis (cálculos en la vía urinaria) y/o nefrocalcinosis (depósitos en el parénquima renal), seguida en el tiempo de inflamación y fibrosis de dicho parénquima, para terminar, si persiste el daño, en enfermedad renal avanzada[3] e incluso exitus, por complicación de la oxalosis (depósito a nivel sistémico del oxalato cálcico). Esta última ocurre cuando la tasa de filtración glomerular alcanza niveles de 30-40 mL/min/1.73m^2, por lo que disminuye la excreción de oxalato al tiempo que continúa su sobreproducción. El paciente entra, por tanto, en una situación de potencial daño a nivel sistémico, donde destaca el depósito de CaOx en el sistema cardiovascular (alteración de la conducción), articulaciones (sinovitis) y huesos (fracturas y dolor)[4,5].

El diagnóstico de esta enfermedad resulta complicado por la heterogeneidad clínica que presentan los pacientes, ya que el escenario incluye a niños con fallo renal, pero también cuadros ocasionales de cálculos sin aparente complejidad añadida. La media de edad al diagnóstico se sitúa en los 5.5 años de edad, pero hay registrados casos pasada la quinta década de vida[6]. Pese a considerarse una enfermedad rara (prevalencia de menos de 1 por cada 2.000 habitantes, en concreto 1/58.000[7]) se cree que son muchos los casos no diagnosticados como Hiperoxaluria Primaria. Un estudio poblacional publicado en la Journal of the American Society of Nephrology en 2015, determinó que frente al dato de prevalencia mencionado (1/58.000) el dato de portadores es de 1/70, una cifra que deja en evidencia la necesidad de llevar a cabo un análisis más amplio de los casos de litiasis renal idiopática[8].

Pronóstico y tratamiento

La eficacia del tratamiento depende en gran medida de la realización de un diagnóstico precoz, cuando el individuo no ha estado expuesto durante tanto tiempo al daño causado por los cristales de CaOx.

La condición de enfermedad crónica hace que adquieran mucha importancia las medidas no farmacológicas, que destacan por su aplicabilidad en cualquier paciente, ya que hace referencia a un cambio de hábito que se puede aplicar a cualquier edad y ante cualquier subtipo de hiperoxaluria. Se trata de evitar los estados de deshidratación, así como los alimentos con alto contenido de oxalato (chocolate, te, espinacas, carambola, ruibarbo...)[3].

Fuera de ello, a día de hoy, son pocas las herramientas terapéuticas que pueden beneficiar a estos pacientes. Cabe destacar, dentro del apartado de tratamiento farmacológico, al piridoxal fosfato (PLP por sus siglas en inglés), que actúa como coenzima de AGT ayudando a la conversión del glioxilato a glicina y evitando así la ruta hacia la producción de oxalato. Sin embargo, sólo da resultado en un 10-30 % de los pacientes con PH1, en concreto, aquellos homocigotos para la mutación p.Gly170Arg o la p.Phe152Ile[9]. Resulta vital, por tanto, determinar de manera precoz la presencia de estas mutaciones, para así poder ofrecer este fármaco y cambiar el pronóstico de estos pacientes.

Otra opción podría ser la hemodiálisis convencional. Esta permite alcanzar tasas de eliminación de 950 a 1440 micromol/día, pero esta cifra resulta mucho menor que la tasa de producción de oxalato en pacientes con PH1, esto es, 3500 a 7500 micromol/día[10].

Intensificar la diálisis a través de métodos como el aumento de horas por día o el uso de esta durante la noche puede funcionar para nivelar la tasa de eliminación y de producción, pero no es útil en la mayoría de los pacientes. Por todo ello, esta herramienta podría quedar reservada principalmente para los casos de trasplante renal, donde una hemodiálisis previa disminuiría los niveles de oxalato lo máximo posible y, por tanto, el daño sobre el riñón trasplantado[11].

Continuando con la línea del trasplante de órganos, cabe destacar que el único tratamiento curativo es el trasplante de hígado, ya que remedia la situación de unos hepatocitos con una AGT malfuncionante. Sin embargo, las complicaciones de la intervención ponen en entredicho su uso (infecciones por el estado de inmunosupresión, efectos secundarios de los inmunosupresores y aparición de neoplasias por dicho estado de depresión del sistema inmune). Además, en un contexto de pacientes que en su mayoría son niños. A su vez, en casos de enfermedad renal avanzada, el trasplante de riñón puede considerarse una alternativa, ya sea en conjunto con el trasplante de hígado o cada uno de ellos por aislado, según la situación del paciente[12].

Pese a las poca opciones disponibles hoy día, hay varias estrategias terapéuticas en fase de investigación, como son: el uso de oxalobacter formigenes para facilitar la excreción intestinal de oxalato al estimular transportadores del epitelio intestinal[13]; cloruro de decualinio (DECA), dirigida a regular el mistargeting a mitocondria[14]; y RNA de interferencia (iRNA), con el objetivo de deplecionar el sustrato (glioxilato) para así aliviar la ruta hacia la producción de oxalato[15].

AGXT y AGT

El gen AGXT se encuentra en el brazo largo del cromosoma 2 (2q36-37) y codifica AGT, un homodímero de 43 kDa y 392 aminoácidos por monómero. Se trata de una enzima dependiente de PLP (piridoxal fosfato, la forma activa de la vitamina B6). Cada monómero se compone de un dominio N-terminal, donde se encuentra el sitio activo y la interfaz de dimerización; y de un pequeño dominio C-terminal, que comprende los residuos 282 al 392, responsable de que, una vez sintetizada, la enzima viaje al peroxisoma[16].

Se han identificado más de 200 mutaciones en los 11 exones que conforman el gen AGXT (Figura 1), siendo el 75 % de las mismas una sustitución de un único nucleótido, incluyendo el 25 % restante inserciones y deleciones[17].

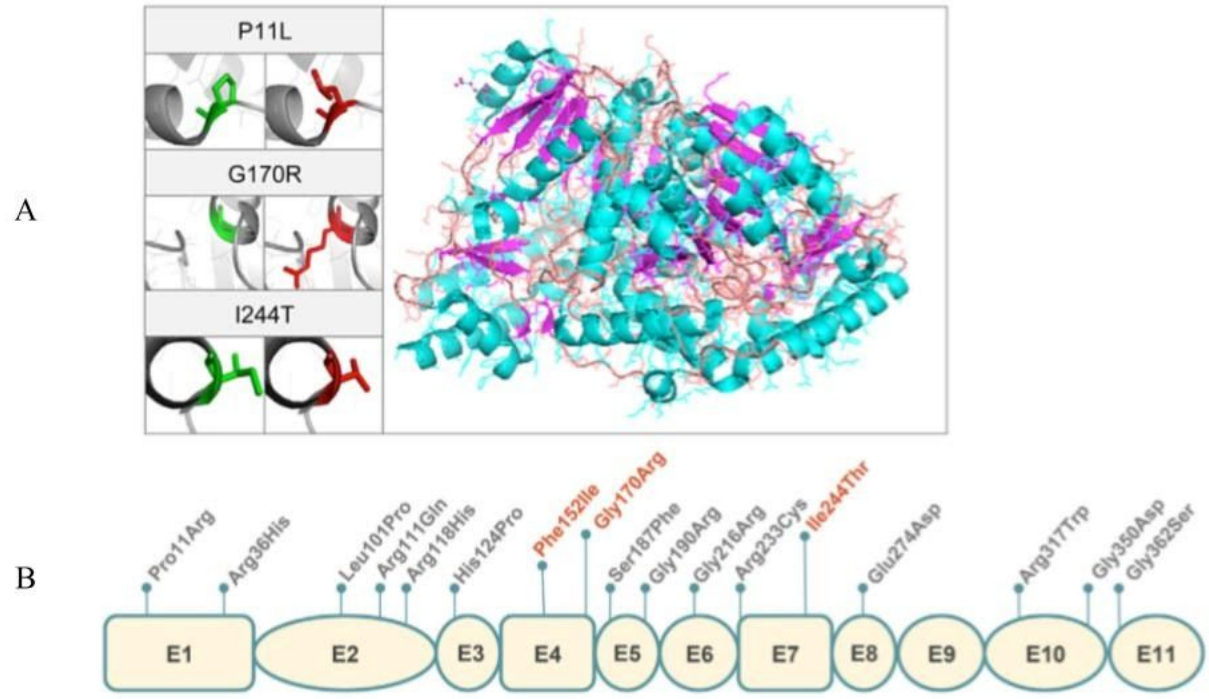


Figura 1. Esquema de AGT y AGXT[16]. **(A) Panel izquierdo:** mediante la herramienta de mutagénesis de Pymol, hemos representado en verde el residuo de la secuencia Wild-type y en rojo el cambio resultante de la mutación. Así, hemos obtenido la representación 3D de las siguiente mutaciones: P11L, prolina de la posición 11 por una leucina; G170R, glicina de la posición 170 por una arginina; y I244T, isoleucina de la posición 244 por una treonina. **Panel derecho:** representación 3D del alelo major de AGT (Protein Data Bank ID: 2YOB). **(B)** Esquema de los 11 exones de AGXT y las principales mutaciones asociadas a PH 1 en cada uno de ellos. Quedan señalados en rojo aquellos que presentan alta frecuencia alélica (Phe152Ile, Gly170Arg y Ile244Thr).

La secuencia del gen AGXT se presenta en la población en dos variantes: alelo major y alelo menor (Figura 2). La primera de ellas, conocida como secuencia Wild Type major; y la segunda de ellas, correspondiente a una variante polimórfica observada también en la población no afecta de PH1[18] , que en el codón 11 presenta un cambio de prolina a leucina (P11L) y en el 340 un cambio de isoleucina a metionina (I340M). Este polimorfismo, además de estar presente en parte de la población sana, asocia con mayor frecuencia PH1 en comparación con la secuencia major, ya que tiene efecto sinérgico con algunas mutaciones[17]. Esto último se explica con el ejemplo de 4 de las mutaciones más frecuentes de AGXT

(G170R, I244T, F152I y G41R), que según ocurran en el contexto de la secuencia minor o no, desestabilizarán a la enzima (si el cambio P11L está presente) o no (si P11L está ausente)[3].

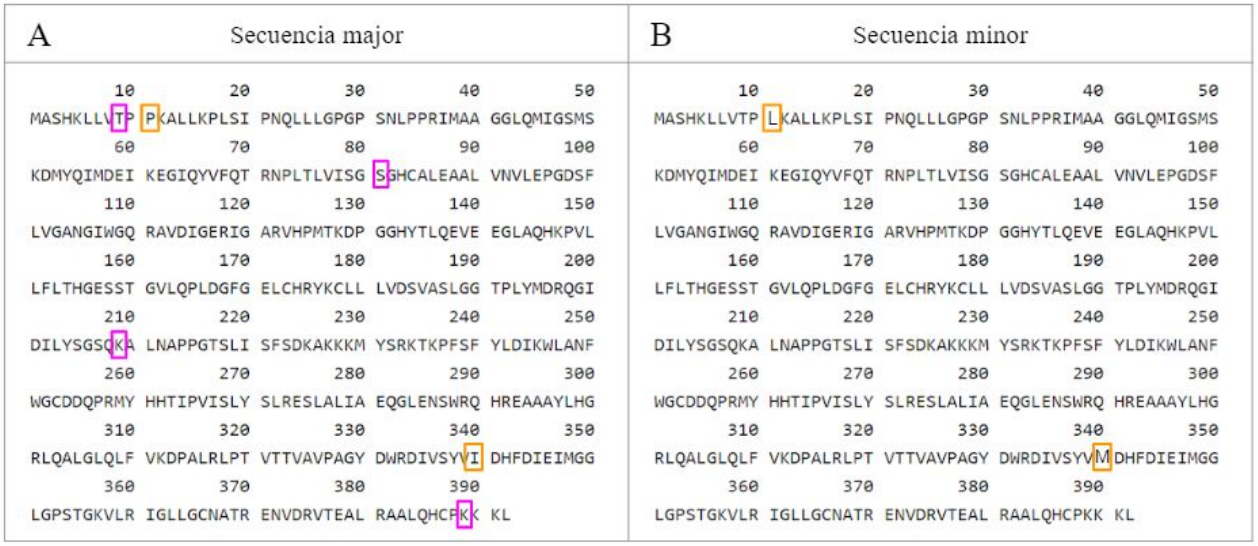


Figura 2. Secuencia de la variante major y minor de AGT (A) En rosa, dentro de la secuencia major, se han encuadrado los aminoácidos de interés en este estudio. Estos son: la treonina de la posición 9 (Thr o T9), la serina de la posición 81 (Ser o S81) y las lisinas de las posiciones 209 (Lys o K209) y 389 (Lys o K389). En naranja, se han señalado los residuos 11 (P: Prolina) y 340 (I: Isoleucina) donde ocurren los cambios responsables de la secuencia minor. **(B)** Queda señalado en naranja, dentro de la secuencia minor, el residuo de la posición 11 con el cambio de prolina a leucina (L: Leucina); y el residuo de la posición 340, con el cambio de isoleucina a metionina (M: Metionina). Ambos marcan la diferencia con el alelo major.

A día de hoy, son más de 200 las mutaciones encontradas en la secuencia AGXT que se han relacionado con el desarrollo de PH1. La relación genotipo-fenotipo no es directa en todos los casos[18], pero algunas mutaciones de AGXT sí se han relacionado con alteraciones concretas de la enzima (mistargeting, agregación o defecto del sitio catalítico) (Figura 3).

Figura 3. Clasificación de las mutaciones asociadas a AGXT basadas en el mecanismo patogénico de las mismas[16]. Se pueden resumir en 3 grandes grupos las consecuencias de las mutaciones de este gen. En esta figura quedan representadas algunas de ellas, para servir como ejemplo de mutaciones que llevan a que se produzca agregación proteica (círculo verde), mistargeting a mitocondria (círculo naranja) y alteración del sitio catalítico (círculo violeta), así como a una combinación de todas ellas (mutaciones Gly41Arg y Gly47Arg).

Además de estos 3 mecanismos patogénicos, se sabe que la enzima puede sufrir proteólisis acelerada y alteración de sitios de interacción con otras proteínas (Figura 4).

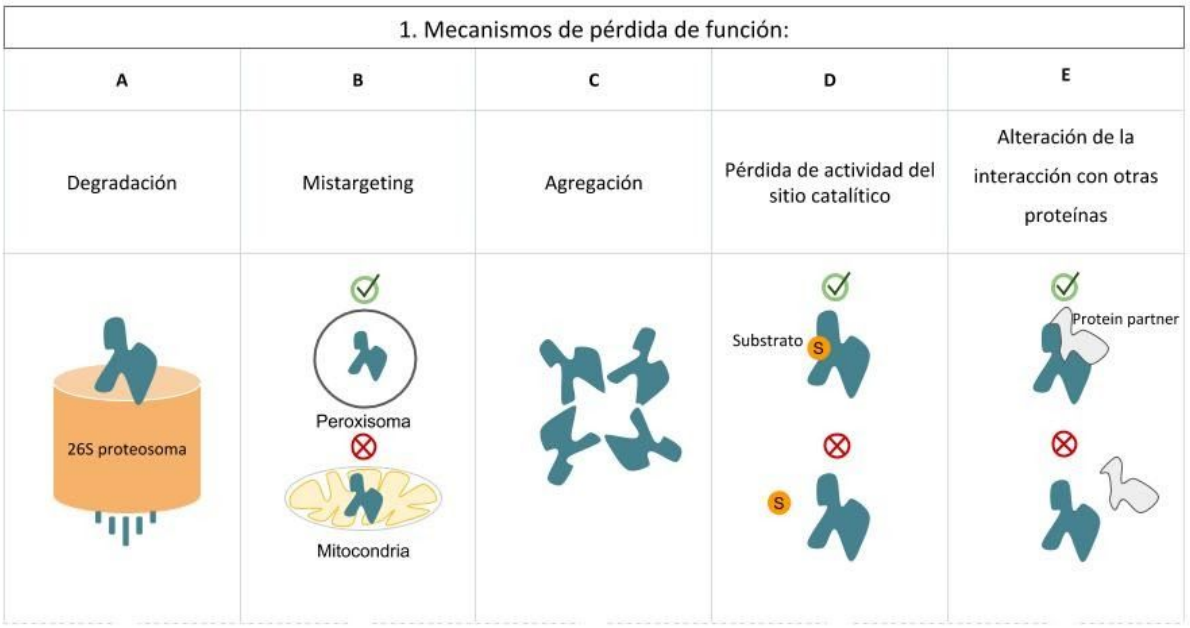


Figura 4. Mecanismos de pérdida de función de AGT[16]. (A) Proteólisis acelerada **(B)** Mistargeting mitocondrial **(C)** Agregación intra peroxisomal **(D)** Pérdida de actividad del sitio catalítico **(E)** Alteración de la interacción con otras proteínas.

Justificación del trabajo

El flujo de información génica sigue una secuencia de pasos que pueden resumirse en replicación, transcripción y traducción. Después de esta última, pueden llevarse a cabo una serie de mecanismos conocidos como modificaciones post-traduccionales, en las que se produce la adición de un grupo funcional a la proteína ya sintetizada (hidroxilación, metilación y glicosilación, entre otros) o se producen modificaciones que enlazan proteínas (ubiquitinación). Dentro de los procesos de adición de grupos funcionales, nos centraremos en la fosforilación y acetilación.

Fosforilación. Para que un aminoácido pueda ser fosforilado, debe presentar en sus cadenas laterales un grupo hidroxilo (-OH) bien expuesto, al que se añadirá el grupo fosfato (PO_4). En eucariotas, los aminoácidos que cumplen dicho criterio son la serina, la treonina y la tirosina[20]. Para nuestra proteína de interés, AGT, nos hemos centrado en la treonina de la posición 9 y en la serina de la posición 81.

Se sabe que la adición de dicho grupo funcional desempeña un papel importante en muchas rutas intracelulares, ya que permite activar-desactivar proteínas postraduccionalmente de

manera reversible, como si de un sistema de encendido-apagado se tratara. Esta función la llevan a cabo familias de enzimas conocidas como kinasas, que añaden grupos fosfato; y fosfatasas, que quitan dichos grupos. Como ejemplo, se encuentran la proteína kinasa B, relacionada con la supervivencia celular; la nefrina 1, que permite la comunicación celular en los podocitos del glomérulo renal (Neph1); y la proteína asociada a muerte celular (DAP por sus siglas en inglés), que induce la apoptosis de linfocitos T y B. Todas ellas, en estado de fosforilación, se encuentran activas y, por tanto, pueden llevar a cabo su función[21].

Acetilación. Por otro lado, la acetilación en eucariotas es también un mecanismo de modificación postraduccional de gran importancia, donde una acetiltransferasa cataliza la donación del grupo acetilo del metabolito acetil-coenzima A (Ac-CoA) a un grupo amino α del extremo N terminal o al grupo amino ε del aminoácido lisina. Esta acetilación del residuo lisina fue por primera vez observada en histonas, de ahí que se les denominara durante un tiempo como acetiltransferas de histonas (HATs por sus siglas en inglés). No obstante, estas proteínas no son las únicas dianas de acetilación de la lisina (K), por lo que el nombre se ha corregido por acetiltransferasas de lisina (KATs por sus siglas en inglés).

Pese a tratarse del mismo mecanismo, cuando se acetila el grupo amino α del extremo N terminal el proceso es irreversible, no así el grupo amino ε de la lisina, sobre la que también pueden actuar deacetilasas de lisina (KDACs por sus siglas en inglés), estableciéndose así un equilibrio entre KATs y KDACs. El desequilibrio de esta maquinaria se ha visto implicado en enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas[22]. Por tanto, la implicación de la acetilación como mecanismo patogénico no se restringe a un grupo específico de proteínas, y nos adentraremos en estudiar este fenómenos en dos residuos lisina del extremo C-terminal: las posiciones 209, perteneciente al sitio activo; y 389, implicado en que AGT viaje a peroxisoma, para así ver si existe alteración en su localización subcelular.

Con lo expuesto anteriormente como base teórica, nos hemos propuesto estudiar si la fosforilación y acetilación influyen, por separado, en la localización de la enzima AGT dentro de la célula (Figura 5), pues la repercusión clínica, en caso de existir relación, podría ser de gran provecho y servir como inicio de nuevas líneas de estudio en la patogenia de la PH1.

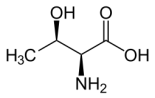
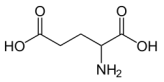
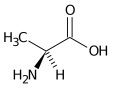
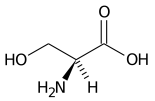
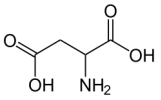
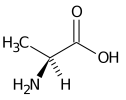
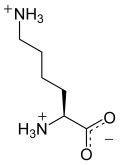
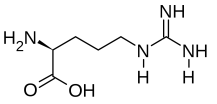
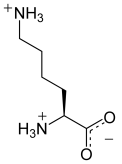
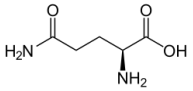
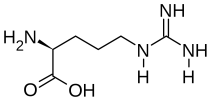
Posición	Secuencia wild-type	Fosfomimética	No fosforilable
9	T (Treonina) 	E (Ácido glutámico) 	A (Alanina) 
81	S (Serina) 	D (Ácido aspártico) 	A (Alanina) 
Posición	**Secuencia wild-type**	**Acetilomimética**	**No acetilable**
209	K (Lisina) 	No realizada	R (Arginina) 
389	K (Lisina) 	Q (Glutamina) 	R (Arginina) 

Figura 5. Posiciones de AGXT estudiadas y estructura molecular de los aminoácidos[20]. En esta tabla se resumen las 4 posiciones (9, 81, 209 y 389) sobre las que se ha realizado un cambio de aminoácido para obtener las versiones fosfomiméticas (ácido aspártico y ácido glutámico) y no fosforilables (alanina), así como las acetilomiméticas (glutamina) y no acetilables (arginina).

Hipótesis de trabajo

Basándonos en la importancia de la modificación postraduccional en las proteínas, hemos planteado la posibilidad de que la localización intracelular de nuestra enzima de interés, AGT, pueda verse modificada por uno de estos fenómenos, es decir, que según estén o no fosforilados o acetilados los aminoácidos elegidos para este trabajo, la proteína viaje al

peroxisoma, en lugar de a la mitocondria; o se vea modificada su expresión en términos cuantitativos.

Para estudiar dicha hipótesis, hemos planteado el estudio de la siguiente manera: 4 posiciones (9, 81, 209 y 389) con dos cambios en cada una de ellas (fosfomimético frente a no fosforilable en los residuos 9 y 81; acetilomimético frente a no acetilable en el residuo 389; y únicamente la versión no acetilable en la posición 209, por razones que explicaremos en los siguientes apartados). Con ello, hemos obtenido un total de 7 modelos diferentes a los que hemos designado un código formado por un número (posición estudiada) y una letra (nuevo aminoácido insertado) (Figura 6A). A esto, hemos añadido un código adicional de letras, que etiquetan a la muestra según el contexto (secuencia) en el que haya sido estudiado (Figura 6B): la Wild-type (A), donde no existen mutaciones, a excepción de la insertada por nosotros; la LM, que corresponde a la secuencia minor ya comentada en apartados anteriores; la LRM, que incluye además un cambio de glicina por arginina en la posición 170 y que es responsable del mistargeting a mitocondria; y la LTM, donde se añade, con respecto a LM, un cambio de isoleucina a treonina en la posición 244 (esta nos interesa porque es la mutación principal de hiperoxaluria en Canarias).

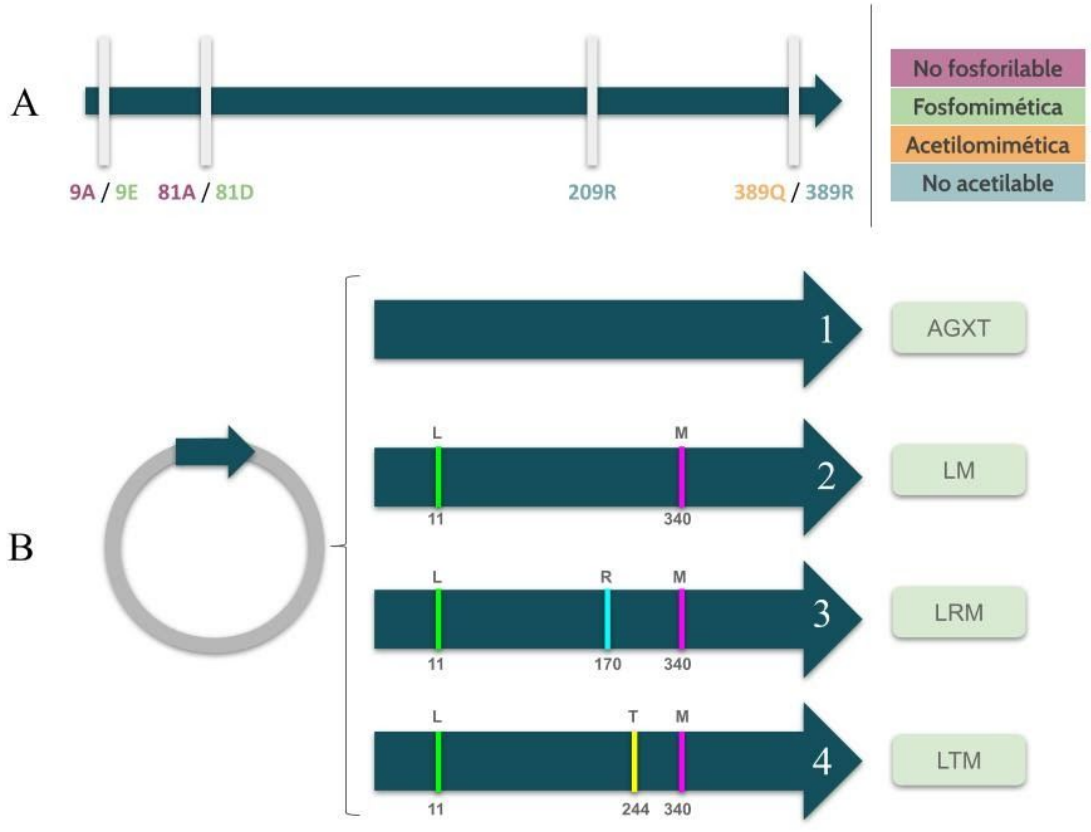


Figura 6. Esquema de los contextos planteados para este proyecto, en adición a las 7 mutaciones estudiadas (A) Representación de las 7 mutaciones estudiadas a lo largo de la secuencia de AGXT (flecha azul oscuro). **(B)** En el plásmido (círculo gris) hemos introducido la secuencia de AGXT (flecha azul oscuro) con cada uno de los 4 contextos: wild-type o A **(1)**, la secuencia minor **(2)**, LRM **(3)** y LTM **(4)**. Todo ello, en conjunto con uno de los 7 cambios de interés representados en la primera parte de la figura.

Con el modelo planteado, hemos obtenido un total de 28 muestras diferentes, que hemos estudiado por inmunofluorescencia, para analizar la localización de AGT dentro de la célula; y mediante Western Blot, para cuantificar la cantidad de enzima expresada por la misma.

Objetivos

1. Estudiar el papel de fosforilación y acetilación en la localización subcelular de AGT, esto es, si se produce o se corrige el mistargeting a mitocondria.
2. Cuantificar la expresión de AGT tras realizar la mutagénesis de cada una de los cambios planteados.

Material y métodos

La parte experimental de este proyecto se ha realizado entre los meses de enero de 2019 y enero de 2020, ya que ha incluido el aprendizaje de los diferentes protocolos y la repetición de los experimentos, hasta conseguir una secuencia de pasos realizados de manera óptima y la obtención de resultados adecuados a la extracción de conclusiones.

A continuación, se expone el protocolo realizado para cada una de las partes de proyecto.

Obtención de plásmidos con la secuencia de AGXT de interés. Las diferentes secuencias de AGXT, con mutaciones en los codones de interés, habían sido generadas previamente en el laboratorio, mediante mutagénesis dirigida. Nuestro trabajo consistió en subclonarlas desde el plásmido de origen pCIneo (para expresión en células de mamífero, como son las CHO - células de ovario de hámster chino) al plásmido pCOLDII, para expresión en E.coli y obtener suficiente proteína recombinante para análisis bioquímico.

- pClneo (resistencia a neomicina): usamos los sitios de NcoI y XbaI (enzimas de restricción) para liberar el fragmento de DNA de 1.2kb que contiene el cDNA de AGXT. Este fragmento se purifica de geles de agarosa.
- pCOLDII: en este plásmido, previamente cortado con NcoI y XbaI, "pegamos" la secuencia de AGXT que cortaron NcoI y XbaI de pClneo.

Purificación de pCOLDII. A 50 ul de plásmido crudo añadimos 200 uL de buffer de unión (alta concentración de sales) y 100 uL de isopropanol, mezclamos y lo pasamos por una columna de purificación por afinidad, centrifugando durante 1 minuto. A continuación, realizamos dos lavados con posterior centrifugación, con una cantidad de 500 uL buffer de lavado (baja sal) para cada uno. Finalmente, añadimos 50 uL de buffer de elución y lo transferimos a un tubo de microcentrífuga, donde tomamos muestra para medir la concentración con Nanodrop™.

Digestión. Una vez purificado y medida su concentración, añadimos 4 uL de buffer, 0.5 uL de NcoI, 1 uL de XbaI y 20 uL de plásmido y lo dejamos a 37º durante 30-60 minutos. Para comprobar que ambas enzimas realizaron el corte en el correspondiente lugar, analizamos las muestras en un gel de agarosa.

Ligación del plásmido. Durante varias horas dejamos la ADN ligasa, el vector y el cDNA de AGXT (inserto) en el frigorífico para que ocurriera la reacción, que posteriormente paramos mediante un golpe de calor a 70º durante 2-3 minutos.

Transformación de E coli. Este paso consiste en la introducción de ADN extraño en una bacteria, en nuestro caso E Coli sensible a ampicilina y tratada con cloruro de calcio. Las tomamos de un stock a - 80º (temperatura a la que sus enzimas quedan inhibidas) y en un tubo de microcentrífuga añadimos 25 uL de E coli y 5 uL de plásmido, que dejamos durante 30 minutos a 4º y luego durante 1 minuto a 40º para reactivar las enzimas de E coli (que estaban inhibidas a - 80º). Añadimos 200 uL de SOC (medio con glucosa) y las dejamos a 37º durante 30 minutos, para luego extenderlas sobre placas de ampicilina. Las guardamos boca abajo a 37º hasta el día siguiente.

Transferencia a medio líquido. En un tubo de ensayo, añadimos 2 mL de medio LB con ampicilina al que transferimos, mediante una punta estéril, la colonia de la placa . Finalmente, incubamos a 130 rpm a una temperatura de 37º toda la noche, para que tuviera lugar el crecimiento bacteriano.

Transferencia a matraz para crecimiento bacteriano. En un matraz añadimos 200 mL de agua mQ y 7 g de LB, para autoclavar durante 30 minutos y posteriormente añadir 200 uL de ampicilina (a razón de 1 uL de amp.100mg/ml por cada mL de medio LB) y 5 mL de starter, siempre bajo mechero de Bunsen para así trabajar en condiciones estériles. Los matraces los dejamos en un agitador durante 24 h a 37º y 120 rpm.

Purificación de plásmidos. La extracción de los plásmidos del interior de la bacteria E coli la llevamos a cabo mediante Maxiprep, para la que preparamos 3 soluciones: P1, con 500 mL de agua mQ a la que añadimos 25 mL Tris 1 M pH 8, 10 mL EDTA 0.5 M y RNAsa; S2, que preparamos bajo campana por el uso de 110 mL de ácido acético, al que añadimos 136 g de acetato de potasio hasta llegar a un volumen final de 250 mL con agua mQ; y S3, que preparamos con 8 g de NaOH y 5 g de SDS (uso de guantes y mascarilla) hasta llegar a un volumen total de 1 L con agua mQ. Una vez preparadas las 3 soluciones, pasamos las muestras de cada matraz a un tubo de plástico para poder centrifugar durante 6 minutos a 5000 rpm y así obtener un pellet que re-suspendimos con la solución P1 y transferimos a un tubo de centrífuga tipo Falcon, con un volumen final de 50 mL. A este último, añadimos 12 mL de solución S2, 12 mL de solución S3 y 2 mL de cloroformo, agitando manualmente entre cada reactivo. A continuación, centrifugamos a 5000 rpm durante 10 minutos y pasamos al sistema de columnas y filtros, para ir añadiendo las siguientes cantidades: 3 mL de NEO buffer, 40 mL de Wash buffer, 11 mL de isopropanol y 15 mL de ELU buffer. Seguidamente, centrifugamos a 5000 rpm durante 30 minutos, descartamos el sobrenadante y lavamos el pellet con 4 mL de etanol al 70 %, que dejamos secar durante 5 minutos. Pasado este tiempo, lo re-suspendimos en 750 uL de TE pH 8 y medimos su concentración con Nanodrop™. Las muestras las dejamos almacenadas a 4º.

Cultivo: descongelado de células CHO. Hicimos uso de células de ovario de hámster chino, que permanecían guardadas a -120º en tanque de nitrógeno. Realizamos un primer cultivo en 5 mL de FBS 10 % durante 24 h, con posterior tripsinización para transferir a placa de 6 pocillos, que dejamos de nuevo durante 24 h a 37 º.

Transfección de plásmidos. Una vez purificados los plásmidos, medimos la concentración con Nanodrop™ para posteriormente calcular los uL a tomar para obtener una cantidad de 2 ug en cada una de las muestras. Mediante la fórmula que proporciona Polyplus-transfection^{SA}, calculamos las cantidades de buffer de transfección y plásmido, añadiendo a la solución 4 uL

de reactivo, con un volumen final de 200 uL por pocillo de la placa de 6 pocillos, que dejamos en incubadora a 37 º durante 24 h.

Inmunofluorescencia. En cada uno de los pocillos de la placa colocamos un cubre, sobre el que realizamos la inmunofluorescencia con 15 uL de anticuerpo primario contra AGXT (GP-AGT) y peroxisoma (Rb-PMP70) con un tiempo de actuación de 0.5 h; y seguidamente 15 uL de anticuerpo secundario contra GPAGT (GP488) y RbPMP (Rb555), también durante 0.5 h. A todas las muestras añadimos DAPI (tinción de núcleos), para realizar una media del total de células por campo de 20X y así calcular el porcentaje de transfección para cada una de las muestras mediante la siguiente fórmula: (células positivas /390) x 100. Asimismo, recogimos en una tabla el patrón de localización de la proteína, obteniendo 5 posibles opciones: no transfección, transfección sin colocalización, colocalización y mistargeting, colocalización casi exclusiva y proteína en citoplasma (Figura 7).

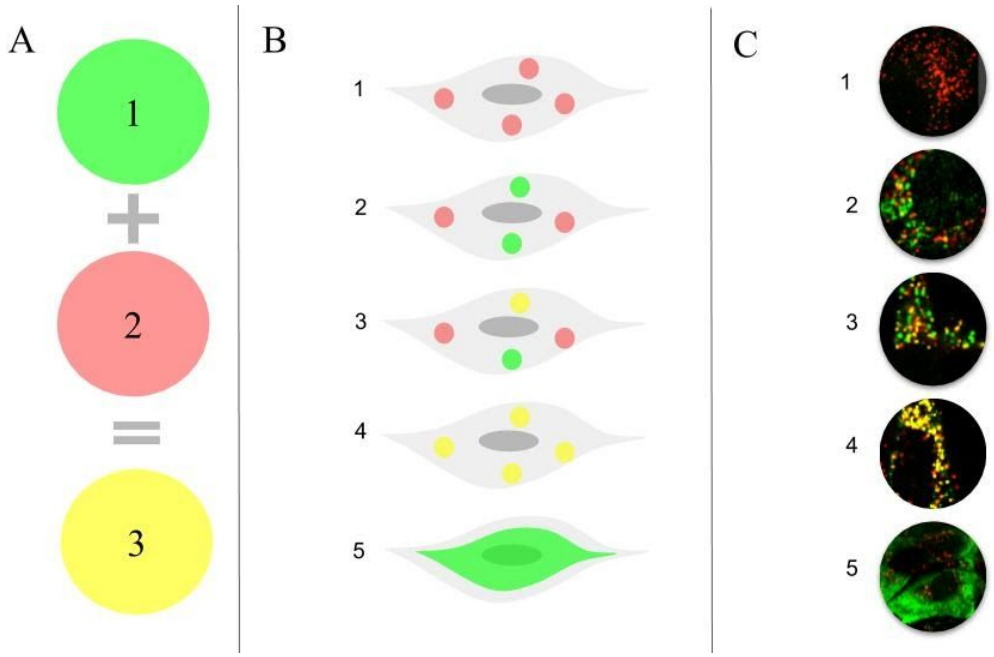


Figura 7. Interpretación de colores en el microscopio confocal. **(A)** Se esquematiza la interpretación de las señales de la siguiente manera: en color verde **(1)**, la proteína AGT; en rojo **(2)**, los peroxisomas; y en amarillo **(3)**, la colocalización, es decir, la fusión de verde y rojo, que representa la localización de AGT en el peroxisoma. **(B)** Se representan los diferentes patrones observados al microscopio confocal: **(1)** no se ha producido transfección del plásmido, por lo que sólo se observa la fluorescencia roja, indicando peroxisomas en la célula; **(2)** se ha producido transfección de plásmidos, pero la falta de señal amarilla indica

que no hay colocalización. Además, la señal verde en punteado indica que la proteína se ha ido a mitocondria (mistargeting); **(3)** existe transfección de plásmido, con parte de la proteína localizada en los peroxisomas (señal amarilla, colocalización) y parte en las mitocondrias (señal verde en punteado, mistargeting); **(4)** la mayor parte de la proteína producida se ha ido a peroxisoma (colocalización); y **(5)** la proteína no ha llegado a su destino final, por lo que se encuentra en el citoplasma, lo que da lugar a una señal verde difusa. **(C)** Imagen al microscopio confocal correspondiente a los esquemas de la figura B.

Western Blot. La muestra sobrante de cada pocillo la congelamos a -80º, hasta realizar la electroforesis con tiempos aproximados de 0.5 h para la stacking fase y de 1 h para la separating fase. Una vez transferida, la membrana de nitrocelulosa permaneció 24 h en leche libre de grasa y así evitar la unión inespecífica del anticuerpo con la membrana. Pasado este tiempo, realizamos durante dos días consecutivos el revelado de AGT, nuestra proteína de interés; y de B-Actina, nuestra proteína control. Para AGT empleamos un anticuerpo primario (Rabbit α AGXT) a concentración de 1:10000 y secundario (HRP α Rabbit) a 1:20000. Para la B-actina, usamos una concentración de 1:10000 tanto para el anticuerpo primario (Mouse α B-actin) como secundario (HRP α Mouse). La señal de esta prueba se desarrolla con substrato de luminiscencia (ECL), que produce luz bajo acción de la peroxidasa (HRP). Los tiempos de exposición fueron en secuencias de 10”, 30”, 60”, 120” y 300” tomando la suma de todos ellos (520”) como imagen a analizar. Finalmente, para la cuantificación de las bandas usamos el programa ImageJ, con el que obtuvimos porcentajes de expresión que corregimos con los porcentajes de transfección. Dichos porcentajes de transfección se obtuvieron en base a la intensidad de la banda, por lo que para aquellas muestras donde no se obtuvo o fue imperceptible, no se pudo llevar a cabo este procedimiento (Figura 11, resultados).

Resultados

El planteamiento realizado nos ha llevado a obtener un total de 28 muestras. Sin embargo, 2 del total (81A LRM y 389Q A) no se han podido incluir en los resultados de inmunofluorescencia, ya que debido a un problema en el manejo de los portas tuvimos que repetir el proceso, y no pudimos llegar a tomar fotos con el microscopio confocal por la situación declarada por Covid-19. Por tanto, nuestro proyecto incluye finalmente 26 muestras para el estudio de la localización subcelular y 28 para el estudio de la expresión.

La organización de los datos la hemos realizado según la posición estudiada (9, 81, 209 y 389) y dentro de cada una de ellas nos hemos basado en el contexto (A, LM, LRM y LTM) para enfrentar la muestra fosfomimética con la no fosforilable o acetilomimética con la no acetilable. No obstante, para la posición 209 sólo realizamos la mutación no acetilable (cambio de lisina a arginina), por lo que hemos incluido únicamente una descripción, sin compararla con la versión acetilomimética. Esto se debe a que la lisina en posición 209 es el residuo que forma el enlace covalente con el cofactor piridoxal-fosfato, por lo que su sustitución por un aminoácido acetilomimético tendría consecuencias complejas de analizar.

Inmunofluorescencia

El estudio mediante microscopio confocal se ha centrado en clasificar las 26 muestras según la localización subcelular de la proteína (Tabla 1): peroxisomal, que es lo normal para la AGT humana y, por tanto, colocaliza con una proteína característica del peroxisoma (PMP70); mitocondrial, como resultado de mistargeting (patológico); y citoplasmático, como resultado de un fracaso del tráfico de la proteína a la organela destino, pero también debido a un exceso de producción de la misma por el sistema experimental utilizado.

Estudio de la fosforilación								
9	**9A A**	**9E A**	**9A LM**	**9E LM**	**9A LRM**	**9E LRM**	**9A LTM**	**9E LTM**
Colocalización								
Mistargeting								
Citoplasma								
81	**81A A**	**81D A**	**81A LM**	**81D LM**	**81A LRM**	**81D LRM**	**81A LTM**	**81D LTM**
Colocalización					-			
Mistargeting					-			
Citoplasma					-			
Estudio de la acetilación								
209	**209R A**	**209R LM**	**209R LRM**	**209R LTM**				
Colocalización								
Mistargeting								
Citoplasma								

389	389R A	389Q A	389R LM	389Q LM	389R LRM	389Q LRM	389R LTM	389 Q LTM
Colocalización		-						
Mistargeting		-						
Citoplasma		-						

Tabla 1. Recogida de datos tras análisis de imágenes tomadas con microscopio confocal. Hemos estudiado la presencia (casilla verde) y ausencia (casilla gris) de los fenómenos de colocalización, mistargeting y proteína en citoplasma para cada una de las posiciones (9, 81, 209 y 389) y contextos (A, LM, LRM y LTM). Hemos encasillado a la mutación fosfomimética con su opuesto no fosforilable y a la acetilomimética con su opuesto no acetilable, a excepción de las muestras de la posición 209, donde sólo hemos realizado la mutación acetilomimética. Las dos muestras no incluidas quedan señaladas en amarillo.

Colocalización. En todas las muestras hemos observado colocalización, es decir, que parte o el total de la proteína producida, según la muestra, ha seguido la ruta hasta el peroxisoma, logrando así una localización de AGT óptima para su funcionamiento. Por tanto, en lo que respecta a presencia o ausencia de colocalización no hemos encontrado diferencias cualitativas (todo-nada) entre las muestras fosfomiméticas - no fosforilables y acetilomiméticos - no acetilables. Sí hemos observado que algunos mutantes colocalizan menos que otros, pero este aspecto de las posibles diferencias cuantitativas en la localización de las variantes estudiadas tiene que ser realizado con más tiempo, en el futuro.

Mistargeting. Este fenómeno lo hemos observado solo en 6 de las 26 muestras realizadas. Se trata de un hallazgo esperable, ya que estas muestras son las estudiadas en el contexto LRM, donde la coexistencia del alelo menor (LM) y la mutación en el residuo 170 (Gly170Arg) llevan a la proteína a irse a mitocondria. Lo destacable es que en esas mismas muestras hemos observado también colocalización (Figura 8). Esto último, como hallazgo también cualitativo, deberá cuantificarse con microscopía confocal más adelante.

Citoplasma. En 16 de las 26 muestras en total hemos observado un patrón difuso en citoplasma, correspondiente con proteína que no ha finalizado su ruta. Esta distribución proteica se observa cuando las proteínas sintetizadas no son capaces de seguir el tráfico subcelular normal o bien cuando se satura el tráfico debido a una sobreproducción proteica en el modelo celular usado.

Espículas. En 2 muestras hemos encontrado unas estructuras intracitoplasmáticas, de señal verde con morfología espiculada, que creemos que se corresponden con precipitados proteicos (Figura 9).

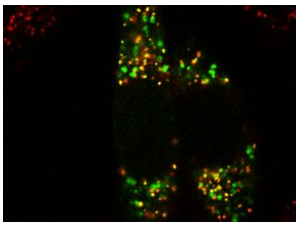
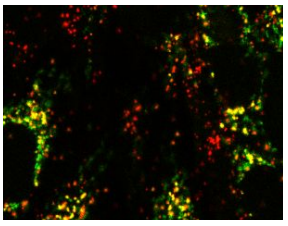
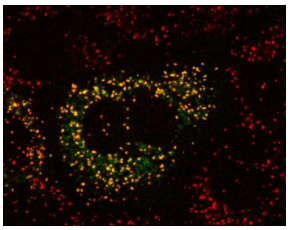
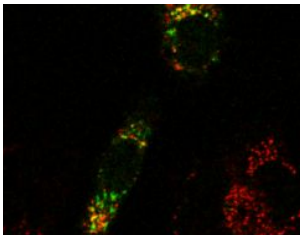
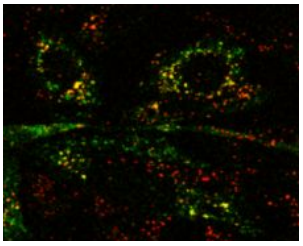
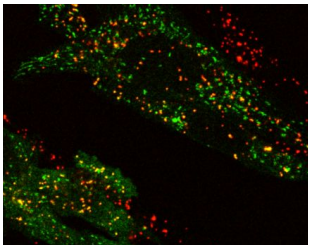
9A LRM	9E LRM	81D LRM
		
209R LRM	**389R LRM**	**389Q LRM**
		

Figura 8. Colocalización en muestras del contexto LRM. Hemos observado colocalización (señal amarilla) de manera cualitativa. Esto significa que AGT, en mayor o menor medida según la muestra, ha viajado al peroxisoma en lugar de a la mitocondria.

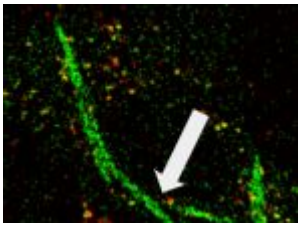
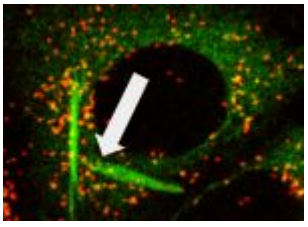
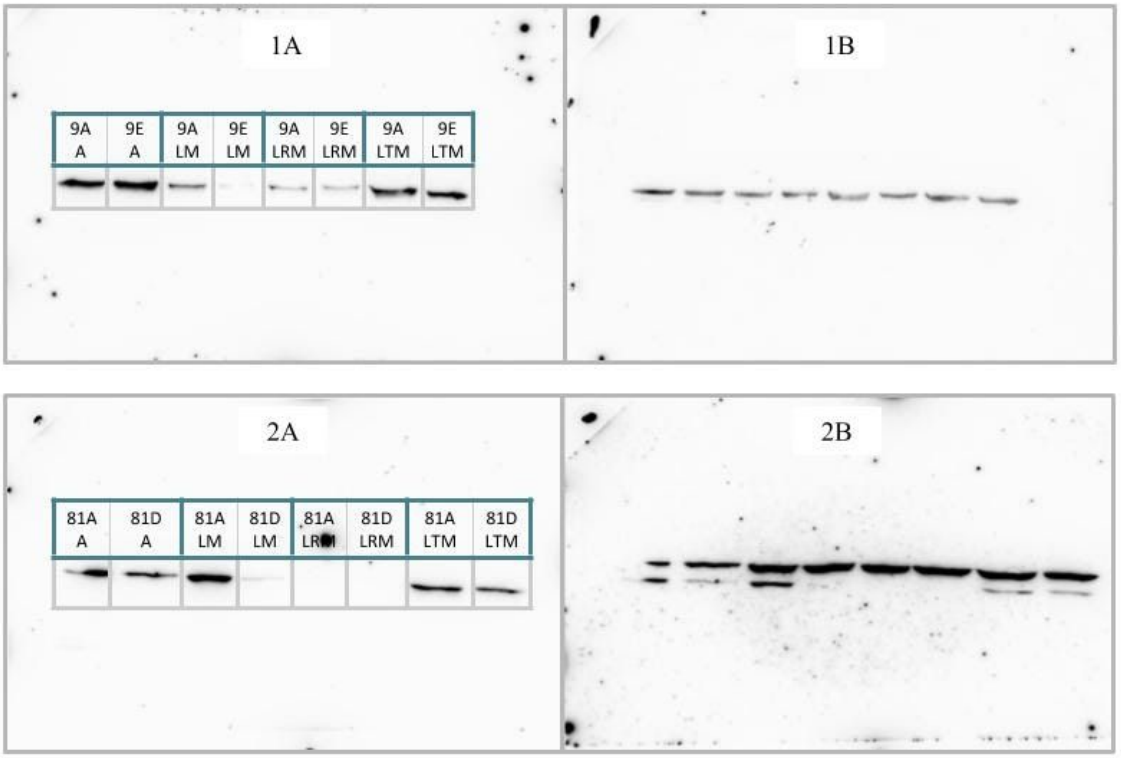
81A A	81D A
	

Figura 9. Espículas. Hallazgo de estructuras con forma de espícula en las muestras 81A A y 81D A.

Western Blot

Análisis descriptivo de las bandas. Para cada una de las posiciones estudiadas hemos obtenido los niveles de expresión, esto es, bandas en el western blot (Figura 10) de nuestra proteína de interés (AGT) y de una proteína control (B-Actina), que nos permite corregir en base a las posibles diferencias que se hayan podido producir durante la carga de proteínas en la electroforesis y durante la transferencia del procedimiento de western blot. La concentración de proteínas en el lisado fue cuantificada por fluorimetría (Qubit) y en cada calle del western se cargó la misma cantidad total de proteínas (20 ug). La banda de B-Actina, por tanto, es bastante homogénea entre las diferentes calles de cada western. Además, en cada experimento de expresión en células CHO hay que tener en cuenta el porcentaje de transfección (Tabla 2), ya que no todas las células incorporan y expresan el plásmido de la misma manera en términos cuantitativos. Por tanto, la interpretación de la intensidad de las bandas de western blot debe hacerse teniendo en cuenta también los porcentajes de transfección (Figura 11). Solo aquellos experimentos en los que dicho porcentaje estaba dentro de una franja del 20-65% se incluyeron en el estudio.



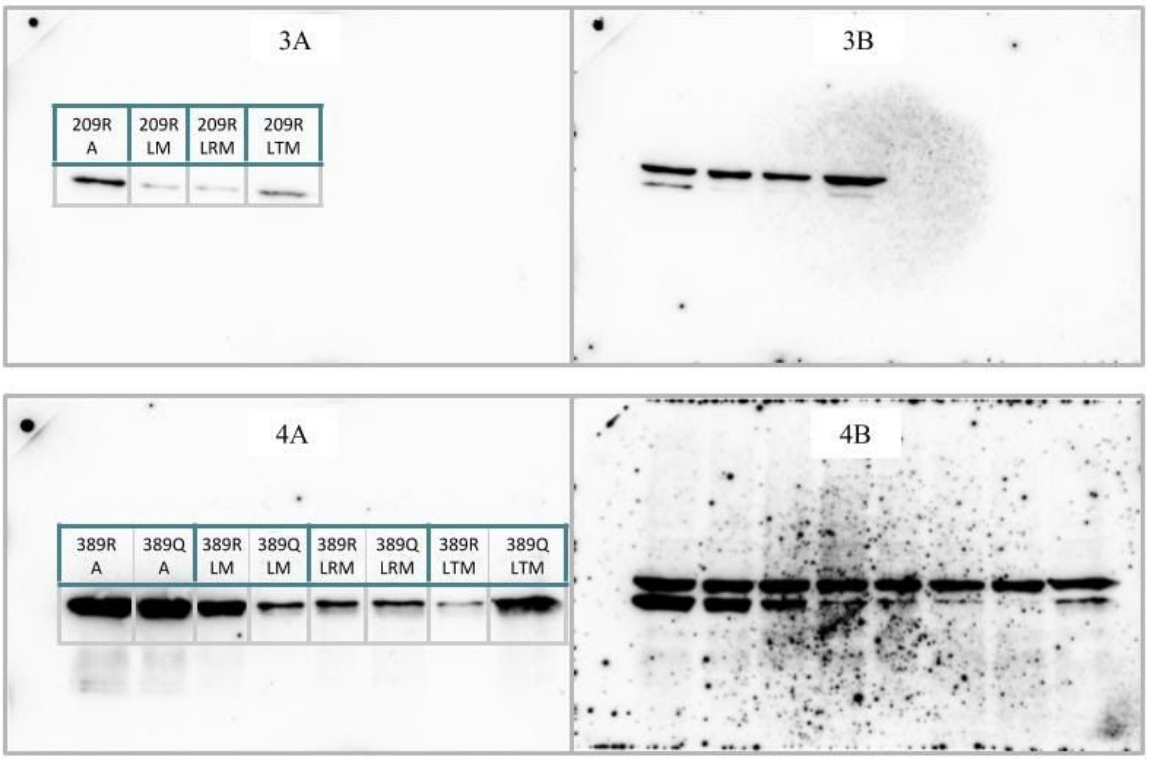


Figura 10. Bandas de Western Blot. Se muestran las bandas de AGT (1A, 2A, 3A y 4A) y B-actina (1B, 2B, 3B y 4B) en la membrana de nitrocelulosa.

9								
Muestra	9A A	9E A	9A LM	9E LM	9A LRM	9E LRM	9A LTM	9E LTM
Transfección	27 %	38 %	45 %	26 %	31 %	32 %	53 %	44 %
81								
Muestra	81A A	81D A	81A LM	81D LM	81A LRM	81D LRM	81A LTM	81D LTM
Transfección	51 %	64 %	39 %	42 %	31 %	31 %	31 %	43 %
209								
Muestra	209R A	209R LM	209R LRM	209R LTM				
Transfección	39 %	39 %	27 %	30 %				

	389							
Muestra	389R A	389Q A	389R LM	389Q LM	389R LRM	389Q LRM	389R LTM	389Q LTM
Transfección	31 %	28 %	42 %	40 %	52 %	58 %	23 %	52 %

Tabla 2. Recogida de datos sobre porcentaje de células transfectadas. Se recogen en esta tabla el porcentaje de células que incorporó el plásmido y expresó la proteína de interés (AGT).

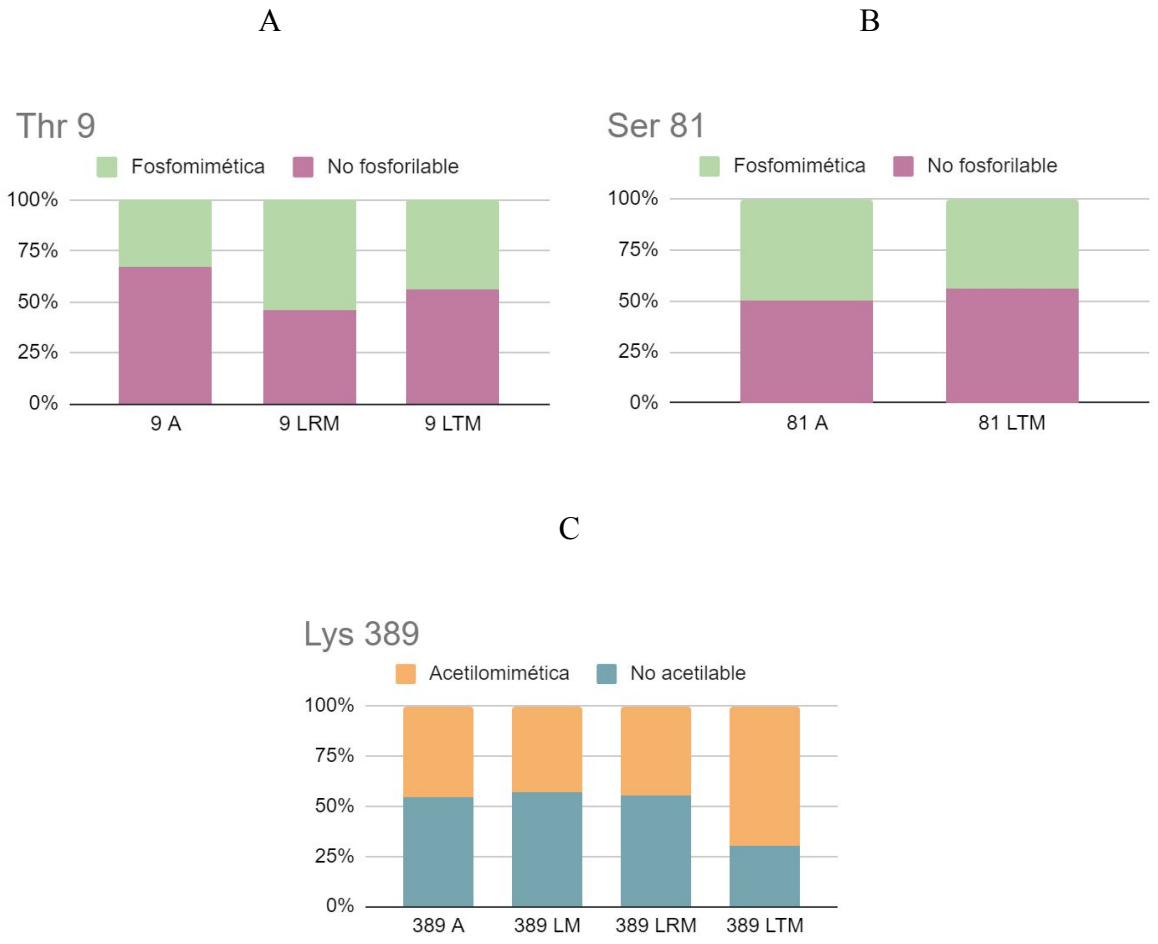


Figura 11. Gráfico de barras apiladas: expresión corregida de AGT. Corrección de los porcentajes de expresión según los porcentajes de transfección y variaciones en la carga del gel (porcentaje de expresión de actina) para la posición 9 **(A),** 81 **(B)** y 389 **(C)**.

Aminoácido 9 (Thr en la secuencia normal). Para unos niveles de transfección en el rango 26-53%, y con bandas de B-Actina similares en todas las calles, observamos que la expresión de la proteína AGT en el contexto LM (es decir, con los polimorfismos 11Leu y 340Met) y LRM (con la mutación p.Gly170Arg además de los polimorfismos 11Leu y 340Met) es sustancialmente inferior a la de esta proteína en contexto wild type major (A, con Pro en posición 11 e Ile en posición 340) y en contexto LTM (con la mutación p.Ile244Thr además de los polimorfismos 11Leu y 340Met). Comparando cada dos calles, en función del aminoácido presente en posición 9 (Thr en la secuencia normal), los resultados apuntan a que la proteína se expresa a niveles similares independientemente de que tenga el aminoácido 9 no fosforilable (Ala, A) o fosfomimético (Glu, E) para los contextos A, LRM y LTM. Por el contrario, en el contexto LM, a primera vista, parece que tener un aminoácido fosfomimético (Glu, E) en posición 9 conlleva niveles de expresión más bajos que si existe Ala (no fosforilable) en esta posición. Ahora bien, si prestamos atención a los porcentajes de transfección conseguidos en estos experimentos, las diferencias observadas pueden justificarse por el porcentaje de transfección baja (26%) obtenido con 9Glu (9E) con respecto al obtenido con 9Ala (9A), que fue del 45%. Aún así, después de corregir por diferencias en transfección (Fig.11), se sigue observando una menor expresión asociada al residuo fosfomimético en posición 9 (9E).

Aminoácido 81 (Ser en la secuencia normal). Para unos niveles de transfección en el rango 31-64%, y con bandas de B-Actina similares en todas las calles, observamos que la expresión de la proteína AGT en el contexto LRM (con la mutación p.Gly170Arg además de los polimorfismos 11Leu y 340Met) es muy baja (no observable en las condiciones del western usadas) respecto a la de esta proteína en contexto wild type major (A) y en contexto LTM. Es asimismo llamativo que en el contexto LM no vemos expresión si el aminoácido en posición 81 es fosfomimético (81D) mientras que se observan niveles altos de la proteína con el aminoácido no fosforilable Ala en esta posición (81A). Comparando cada dos calles, en función del aminoácido presente en posición 81, apreciamos que los niveles de transfección son bastante parejos, por lo que las diferencias en niveles de expresión observadas deben tener una justificación biológica. En concreto, para niveles de transfección del 39 y 42% respectivamente, se observa que AGT con un aminoácido no fosforilable en posición 81 (Ala) es mucho más estable, en el contexto LM (con los polimorfismos característicos del haplotipo minor) que si la posición 81 está ocupada por un aminoácido ácido, con grupo lateral

carboxilo (Asp), estructuralmente asimilable a un aminoácido fosforilado constitutivamente (fosfomimético).

Aminoácido 209 (Lys en la secuencia normal). Para unos niveles de transfección en el rango 27-39 %, y con bandas de B-Actina similares en todas las calles (evidencia de que el western está bien equilibrado), observamos que la expresión de la proteína AGT en la posición 209 es más marcada en el contexto A, seguida del contexto LTM. Aunque también presente, la expresión en los contextos LM y LRM ha sido mucho más baja. Los porcentajes de transfección no explican dicho hallazgo, pues el porcentaje de transfección para el contexto A (banda de mayor expresión) es el mismo (39 %) que para el contexto LM (banda de menor expresión). No hemos dedicado mucho esfuerzo a la experimentación sobre el estado de acetilación de Lys209 porque este residuo juega un papel central en la configuración del centro activo del enzima y se nos hace muy difícil interpretar posibles variaciones encontradas. Efectivamente, el cofactor PLP (piridoxal fosfato por sus siglas en inglés) tiene que posicionarse en el sitio activo del enzima para que el mecanismo "ping-pong" de transaminación ocurra normalmente y para ello ha de establecerse un enlace covalente tipo base de Schiff entre el C4A de PLP y el N del grupo lateral de la Lys209.

Aminoácido 389 (Lys en la secuencia normal). Para unos niveles de transfección en el rango 23-58 %, y con bandas de B-Actina similares en todas las calles, observamos que la expresión de la proteína AGT en el contexto LM (polimorfismos 11Leu y 340Met) en su versión no acetilable (389R LM) es algo mayor que la mutación acetilomimética (389Q LM), aun presentando porcentajes de transfección similares, esto es, 42 % y 40 %, respectivamente. En el contexto LTM, a primera vista parece que la mutación acetilomimética (389Q LTM) presenta un nivel de expresión mayor que la versión no acetilable (389R LTM), pero esto se ve influenciado por porcentajes de transfección bastante dispares (52 % y 23 %, respectivamente). Aún así, como se aprecia en la Figura 11 (resumen de las expresiones relativas después de corregir por diferencias de carga en el gel y de porcentajes de transfección), parece claro que en el contexto LTM la presencia del aminoácido acetilomimético en posición 389 se asocia a mayor expresión en el western. Para los otros dos contextos (A y LRM), las bandas obtenidas y analizadas por parejas parecen indicar que no hay una diferencia notable en los niveles de expresión entre la mutación no acetilable y la acetilomimética, esto es, entre 389R A frente a 389Q A y 389R LRM frente a 389Q LRM. Al comparar por contextos, sí resulta importante la diferencia de bandas entre el

contexto A y el LRM, donde el primero muestra bandas mucho más robustas que el segundo, pese a que los porcentajes de transfección muestran lo contrario (alrededor de 29 % para A y sobre el 55 % para LRM).

Discusión

La estructura del enzima AGT pone de manifiesto la presencia de diferentes puntos que resultan claves en el funcionamiento de la misma (Figura 12). Las cuatro posiciones estudiadas se presentan a diferentes alturas a lo largo de su secuencia[23]: en la extensión N terminal que rodea a parte del otro monómero encontramos nuestro residuo de interés treonina (posición 9); en la interfase de dimerización, a la serina de la posición 81; en el centro activo, a la lisina 209; y en la posición 389, a la lisina que forma parte del extremo C terminal y que participa en la interacción con el receptor PEX5P, clave en la entrada al peroxisoma, a través de la interacción con el dominio PTS1[24].

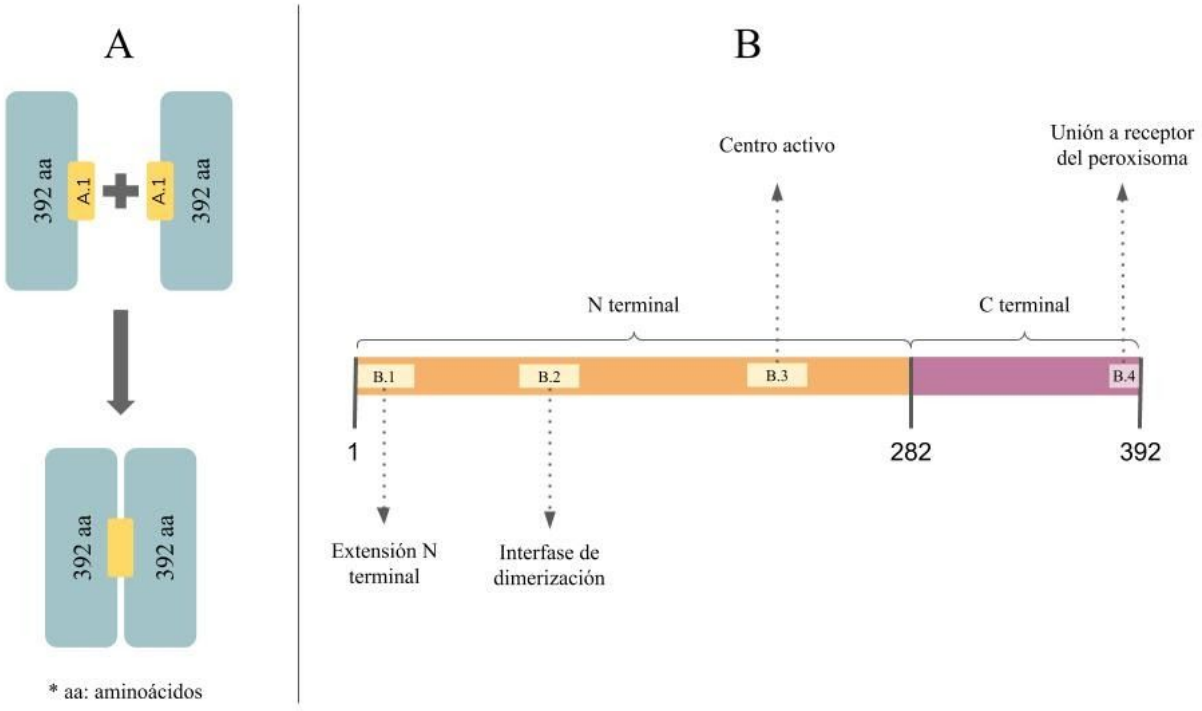


Figura 12. Estructura de AGT. (A) AGT es un homodímero, con 392 residuos formando cada monómero. Parte de la secuencia N-terminal conforma la interfase de dimerización (A.1). **(B)** Cada una de las posiciones de interés pertenece a una estructura clave dentro de la enzima. **(B.1)** En el rango de aminoácidos 1-21, dentro del extremo N-terminal, se encuentra

nuestro aminoácido de interés Thr (posición 9). Esta secuencia forma la extensión N terminal, que rodea a parte de la secuencia N-terminal del otro monómero. **(B.2)** La posición de interés 81 (Ser) forma parte de una de las varias alfa-hélices (81-94) que componen, junto con bucles alfa-alfa y beta-beta, la interfase de dimerización. **(B.3)** La lisina de la posición 209 es clave en la configuración del centro activo y en la interacción de este con el cofactor PLP, pues se debe establecer un enlace covalente entre el grupo amino de la lisina y el grupo aldehído del carbono 4 de PLP. **(B.4)** La lisina de la posición 389 pertenece a la secuencia dentro del extremo C terminal que interacciona con el receptor PEX5P en el peroxisoma.

Localización subcelular.

Colocalización. El estudio de la localización subcelular de AGT lo hemos hecho de manera cualitativa, mediante inmunofluorescencia con dos anticuerpos, uno dirigido contra AGT y el otro contra una proteína de la membrana del peroxisoma (PMP70). En el humano, AGT es de localización exclusivamente peroxisómica salvo en pacientes de hiperoxaluria con algunas mutaciones, como p.Gly170Arg en contexto del haplotipo minor (combinación que hemos llamado LRM en el presente proyecto y que tiene una localización predominantemente mitocondrial -mistargeting-). De manera cualitativa y en un análisis incompleto, hemos observado que todas las variantes estudiadas tiene algo de colocalización, incluso aquellas en fondo LRM, que en condiciones normales sufren mistargeting mayoritario. Queda pendiente el estudio detallado, con microscopía confocal, de los porcentajes de colocalización y la repetición de experimentos que no tienen calidad suficiente para llegar a una conclusión. Es una tarea que requiere muchas horas de confocal, análisis de imagen y tratamiento estadístico de los datos. Servirá, por tanto, como punto a tratar en la continuación de este proyecto.

Mistargeting. Ninguno de los modelos planteados ha favorecido que AGT viaje a la mitocondria más de lo esperado, es decir, que sólo en el contexto LRM hemos observado mistargeting. Asimismo, ninguno de los modelos ha evitado que gran parte de la proteína producida viajara a esta organela (siempre dentro del contexto LRM, donde la ruta a mitocondria es lo esperado). Lo interesante está en la observación de colocalización en paralelo al mistargeting, es decir, que pese a no corregirse del todo la ruta de la proteína, sí se ha restituido parte de su viaje. Por tanto, hemos identificado cambios de aminoácidos que parecen revertir parcialmente el mistargeting a la mitocondria en el contexto LRM. De nuevo, esto lo hemos analizado de manera cualitativa, por lo que un futuro análisis cuantitativo nos

llevará a obtener conclusiones más exactas de estos modelos planteados (mutaciones fosfomiméticas - no fosforilables y acetilomiméticas - no acetilables en el contexto LRM).

Expresión proteica.

Estudio de la fosforilación. En relación con la expresión proteica, las diferencias encontradas entre la versión fosfomimética frente a la no fosforilable (una vez corregidas las diferencias en el porcentaje de transfección y pequeñas diferencias de carga, corregidas con el control de beta actina) ha sido únicamente notable en el contexto LM de las posición 81, donde obtuvimos porcentajes de transfección muy parecidos (39 % en la versión no fosforilable (81 A LM) y 42 % en la fosfomimética (81D LM) y bandas muy dispares (robusta para 81A LM e imperceptible para 81D LM). Este hallazgo da pie a la especulación que el residuo 81 en la proteína AGT es no solo fosforilable sino que su estado de fosforilación se asocia a la expresión de la proteína en el contexto del haplotipo minor (LM). No obstante, en el contexto LRM (con la mutación p.Gly170Arg además de los polimorfismos 11Leu y 340Met) tanto la forma con el aminoácido no fosforilable como el fosfomimético tienen niveles de expresión bajos. Serán necesarios futuros estudios que profundicen en la relevancia del estado de fosforilación de la Ser81 tanto en el haplotipo minor (LM) como en el major (A). El contexto de este aminoácido es particularmente relevante, ya que la alfa-hélice integrada por los aminoácidos 81-94 es parte central de la interfaz de dimerización de la proteína y dos de los tres átomos de oxígeno del fosfato del cofactor piridoxal fosfato forman puentes de hidrógeno con el NH peptídico de la Gly82 y con el grupo lateral de la His83, respectivamente. Resulta conveniente señalar que en paralelo con el trabajo de este proyecto de fin de carrera, se está llevando a cabo la caracterización bioquímica de todos los mutantes generados, usando proteína recombinante producida en E.coli por el Dr. Ángel Pey, en el Dept. Química Física de la Universidad de Granada.

Con respecto a la posición 9, queremos señalar que los resultados apuntan a que la proteína es estable y se expresa a niveles similares independientemente de que tenga el aminoácido 9 (Thr nativo) como no fosforilable (Ala) o fosfomimético (Asp) en los 4 contextos.

Estudio de la acetilación. En relación con la expresión proteica y las diferencias encontradas entre la versión acetilomimética frente a la no acetilable, estas han sido únicamente observadas en los contextos LM y LTM de la posición 389. El porcentaje de transfección influye bastante en los hallazgos obtenidos en las bandas de 389 LTM, pero no así en las de 389 LM, donde las bandas fueron dispares pese a presentar porcentajes muy similares de

transfección: 42 % en la versión no acetilable (389R LM) y 40 % en la acetilomimética (389Q LM). De esta pareja, fue la versión no acetilable la que presentó un nivel mayor de expresión. En la estructura 3D de la proteína AGT, el extremo Ct (aminoácidos 283-392) juega un papel fundamental para interaccionar con el dominio PTS1 del receptor de peroxisoma PEX5P, al que debe unirse para ser dirigida al peroxisoma. Más concretamente, los últimos residuos (389–392) forman la secuencia mínima (KKKL en la AGT humana) que interacciona con la cavidad central del dominio TPR de PEX5P[24]. Podríamos especular que la acetilación de la Lys389 intervenga en el grado de importación al peroxisoma y su entrada alternativa a otras organelas o a rutas de degradación proteica. Como ya hemos señalado, será en un futuro estudio donde profundizaremos este hallazgo.

Conclusiones

La realización de este trabajo de fin de grado ha dejado varias preguntas sobre la mesa que requieren de su continuación para así extraer conclusiones sólidas sobre las consecuencias de la fosforilación y acetilación en la enzima AGT. Los hallazgos encontrados podrían ser estudiados con mayor exhaustividad en un futuro proyecto de doctorado en el que, partiendo de los errores y logros de este trabajo, podamos llegar a conocer un poco más sobre los mecanismos patogénicos de la hiperoxaluria primaria. Pero por el momento, concluimos el proyecto con 4 puntos:

- Todos los modelos planteados permiten que AGT llegue al peroxisoma (colocalice con PMP70), pero ¿a qué nivel, cuantitativamente hablando, lo hace para cada uno de los mutantes?
- Los mutantes diseñados han revertido parcialmente, en el contexto LRM, el mistargeting de AGT. Pero ¿cuál de ellos logra una mejor redirección de la ruta a mitocondria?. Parece ser que el estado de fosforilación de la posición 81 puede contribuir sustancialmente.
- El cambio a un aminoácido fosfomimético (ácido aspártico) en la serina de la posición 81 en el contexto LM ha llevado a que AGT presente niveles de expresión mucho menores que en su versión con un residuo no fosforilable (alanina). Esto parece apuntar a que la fosforilación de este residuo resulta importante en la estabilidad de la enzima cuando se trata del alelo menor.

- La posición 389, en su versión acetilomimética (glutamina) presentó niveles menores de expresión que la no acetilable (arginina). Este resultado da pie a pensar que la acetilación de la lisina esté alterando no sólo los niveles de expresión de AGT, sino que además pueda estar implicada en el mistargeting, ya que su localización es clave en el dominio de unión a peroxisoma.

¿Qué he aprendido durante este TFG?

Habilidades y conocimientos aprendidos:

1. Bases moleculares de la hiperoxaluria primaria tipo 1.
2. Purificación y transfección de plásmidos.
3. Cultivo celular y lisado mediante sonicación para posterior realización de Western Blot e inmunofluorescencia.
4. Uso de microscopio de fluorescencia y confocal (software Leica LASX).
5. Representación de mutaciones con Pymol.

Bibliografía

1. Víctor Lorenzo, Armando Torres-Ramírez, Armando Torres, Eduardo Salido. Primary hyperoxaluria. Nefrologia 2014;34(3):398-412
2. Salido E, Pey AL, Rodríguez R, Lorenzo V. Primary hyperoxalurias: disorders of glyoxylate detoxification. Biochim Biophys Acta. 2012 Sep;1822(9):1453-64
3. Milliner DS, Harris PC, Cogal AG, Lieske JC. Primary Hyperoxaluria Type 1. GeneReviews® [Internet]. 2002 [consultado 26 enero 2020]. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301460
4. Mookadam F, Smith T, Jiamsripong P, Moustafa SE, Monico CG, Lieske JC, Milliner DS. Cardiac abnormalities in primary hyperoxaluria. Circ J. 2010 Nov;74(11):2403-9
5. Bacchetta J, Boivin G, Cochat P. Bone impairment in primary hyperoxaluria: a review. Pediatr Nephrol. 2016 Jan;31(1):1-6
6. John C. Lieske et al. International registry for primary hyperoxaluria. Am. J. Nephrol. 2005;25(3):290-296

7. Genetics Home Reference [Internet]. Bethesda (MD). National Library of Medicine (US); [consultado 6 de febrero 2020]. Disponible en: https://ghr.nlm.nih.gov/condition/primary-hyperoxaluria#statistics
8. Hopp K et al. Phenotype-Genotype Correlations and Estimated Carrier Frequencies of Primary Hyperoxaluria. J Am Soc Nephrol. 2015 Oct;26(10):2559-70
9. Christiaan S.Van Woerden et al. Clinical implications of mutation analysis in primary hyperoxaluria type 1. Kidney Int. 2004 ;66(2):746-752.
10. Hoppe B et al. Oxalate elimination via hemodialysis or peritoneal dialysis in children with chronic renal failure. Pediatr Nephrol. 1996 Aug;10(4):488-92.
11. F.Illies, K.-E.Bonzel, A.-M.Wingen, K.Latta, P.F.Hoyer. Clearance and removal of oxalate in children on intensified dialysis for primary hyperoxaluria type 1. Kidney Int. 2006 ;70(9):1642-1648.
12. Bergstralh EJ1, Monico CG, Lieske JC, Herges RM, Langman CB, Hoppe B, Milliner DS. Transplantation outcomes in primary hyperoxaluria. Am J Transplant. 2010 Nov;10(11):2493-501
13. Arvans D, Jung YC, Antonopoulos D, Koval J, Granja I, Bashir M. Oxalobacter formigenes-Derived Bioactive Factors Stimulate Oxalate Transport by Intestinal Epithelial Cells. J Am Soc Nephrol. 2017 Mar;28(3):876-887
14. Miyata N, Steffen J, Johnson ME, Fargue S, Danpure CJ, Koehler CM. Pharmacologic rescue of an enzyme-trafficking defect in primary hyperoxaluria 1. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Oct 7;111(40):14406-11
15. Liebow A, Li X, Racie T, Hettinger J, Bettencourt BR, Najafian N, Haslett P. An Investigational RNAi Therapeutic Targeting Glycolate Oxidase Reduces Oxalate Production in Models of Primary Hyperoxaluria. J Am Soc Nephrol. 2017 Feb;28(2):494-503
16. Barbara Cellini, Isabel Betancor-Fernandez, Silvia Grottelli, Nicole Fontana, Ilaria Bellezza, Eduardo Salido. Vitamin B6-dependent enzymes and disease. Protein Homeostasis Diseases. 1. London, UK: Elsevier; 2020. 197-214.
17. Williams EL1, Acquaviva C, Amoroso A, Chevalier F, Coulter-Mackie M, Monico CG. Primary hyperoxaluria type 1: update and additional mutation analysis of the AGXT gene. Hum Mutat. 2009 Jun;30(6):910-7

18. Cellini B, Montioli R, Paiardini A, Lorenzetto A, Voltattorni CB. Molecular Insight into the Synergism between the Minor Allele of Human Liver Peroxisomal Alanine:Glyoxylate Aminotransferase and the F152I Mutation. J Biol Chem. 2009 Mar 27;284(13):8349-58
19. Katharina Hopp, Andrea G. Cogal, Eric J. Bergstralh, Barbara M. Seide, Julie B. Olson, Alicia M. Meek. Phenotype-Genotype Correlations and Estimated Carrier Frequencies of Primary Hyperoxaluria. JASN October 2015, 26 (10) 2559-2570
20. David Whitford. Proteins: Structure and Function. England: John Wiley & Sons, Ltd; 2005
21. Fatima Ardito, Michele Giuliani, Donatella Perrone, Giuseppe Troiano, Lorenzo Lo Muzio. The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). Int J Mol Med. 2017 Aug; 40(2): 271–280.
22. Adrian Drazi, Line M.Myklebust, Rasmus Ree, Thomas Arnesen. The world of protein acetylation (Review). BBA-GEN SUBJECTS. June 2016 1372-1401
23. Zhang X1, Roe SM, Hou Y, Bartlam M, Rao Z, Pearl LH, Danpure CJ. Crystal structure of alanine:glyoxylate aminotransferase and the relationship between genotype and enzymatic phenotype in primary hyperoxaluria type 1. J Mol Biol. 2003 Aug 15;331(3):643-52.
24. Molecular recognition of PTS-1 cargo proteins by Pex5p: implications for protein mistargeting in primary hyperoxaluria. Mesa-Torres, Tomic N, Albert A, Salido E, Pey AL. Biomolecules. 2015 Feb 13;5(1):121-41

Documentación adicional

Durante la realización de este trabajo de fin de grado, he colaborado con mi tutor en la elaboración del capítulo "Vitamin B6-dependent enzymes and disease" del libro "Protein Homeostasis Diseases". Mi tarea ha consistido en la elaboración de figuras (algunas de ellas añadidas y modificadas al español para este TFG), que adjunto a continuación.

Cita bibliográfica:

- *Libro*: Ángel L. Pey. Protein Homeostasis Diseases. 1. London, UK: Elsevier; 2020
- *Capítulo:* Bárbara Cellini, Isabel Betancor-Fernandez, Silvia Grottelli, Nicole Fontana, Ilaria Bellezza, Eduardo Salido. Vitamin B6-dependent enzymes and disease. Protein Homeostasis Diseases. 1. London, UK: Elsevier; 2020. 197-214.

Figuras:

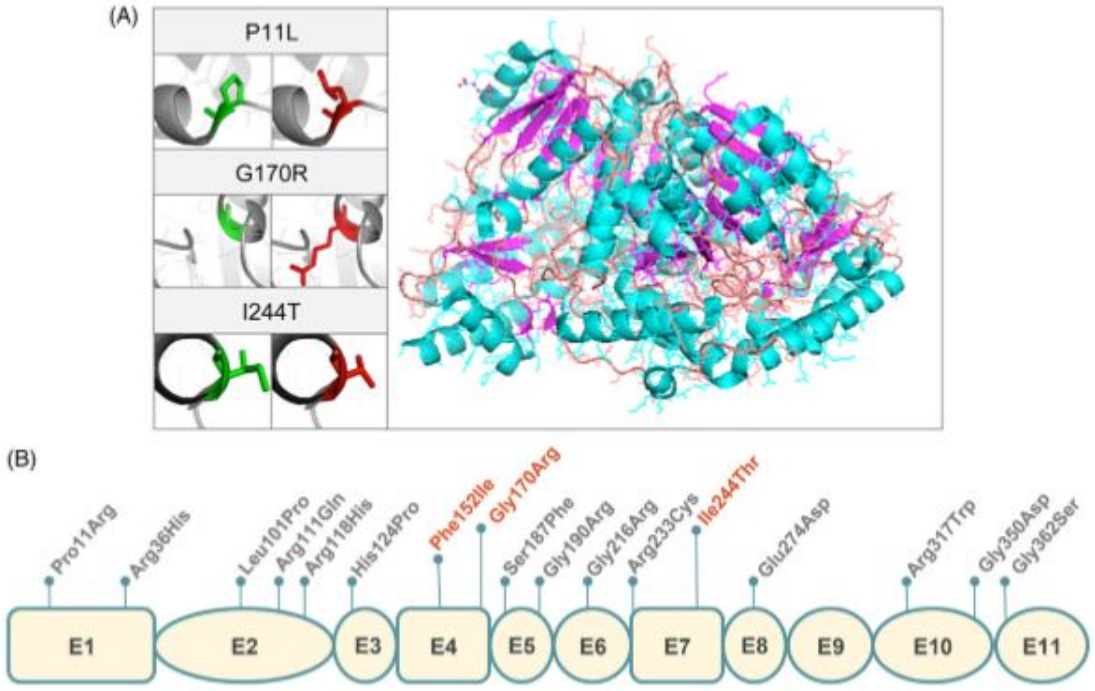


Figure 10.3 (A) Frequent mutated sites are represented in the three-dimensional (3D) structure of AGXT (Protein Data Bank ID: 2YOB). Left panel: using the mutagenesis tool by Pymol, we mutated proline in position 11 to leucine; glycine in position 170 to arginine; and isoleucine in position 244 to threonine. Right panel: AGXT 3D structure is shown. (B) AGXT exons and the principal PH1-associated mutations. Notice in red those presenting a higher allelic frequency: Gly170Arg, Ile244Thr, and Phe252Ile. (C) Classification of PH1-associated mutations based on their pathogenic mechanism *(color online)*.

Figure 10.3 (*Continued*)

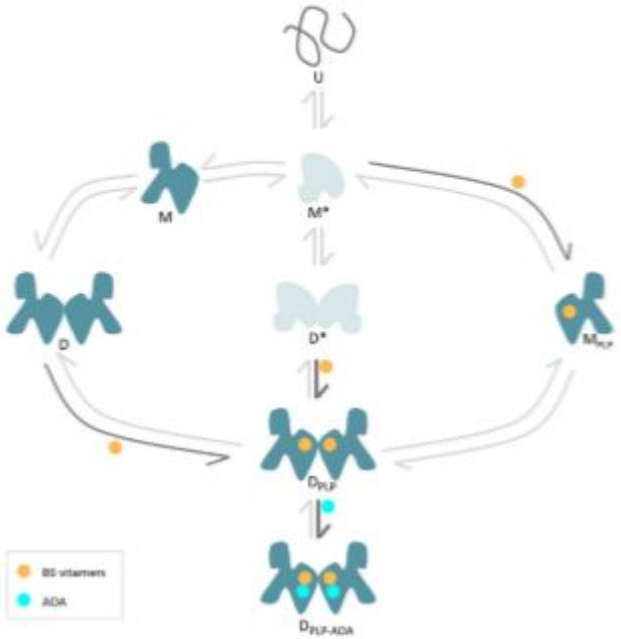


Figure 10.4 ***Possible prosthetic and chaperoning effects of B6 vitamers and aminotransferase inhibitor (AOA) on the alanine-glyoxylate aminotransferase (AGT) folding pathway.*** The unfolded chain is proposed to form a partly folded monomer (**M***) that can either complete folding (**M**) and dimerize into a folded apodimer (D) before binding PLP (pyridoxal-5′ phosphate) (pathway to the left) or bind the cofactor to form a holo-monomer (M_{PLP}) that then dimerizes (pathway to the right). It is also possible that a partially unfolded apodimer (D^*) binds PLP to form the active fully folded holodimer (D_{PLP}). The folded holodimer is further stabilized upon binding of its substrate (or the competitive inhibitor aminooxyacetic acid [AOA]) to achieve the three-dimensional structure described (Protein Data Bank ID: 1H0C). Most pathogenic mutations associated with PH1 cause folding defects that then lead to a variety of downstream effects including increased degradation or aggregation, dimer destabilization, or mistargeting. *D*, Folded apodimer; D_{PLP}, folded holodimer; $D_{PLP\text{-}AOA}$, AOA analogs-holodimer complex; D^*, partly unfolded apodimer; D^*_{PLP}, partly unfolded holodimer; *M*, folded monomer; M^*, partly unfolded monomer; *U*, Unfolded polypeptide chain.

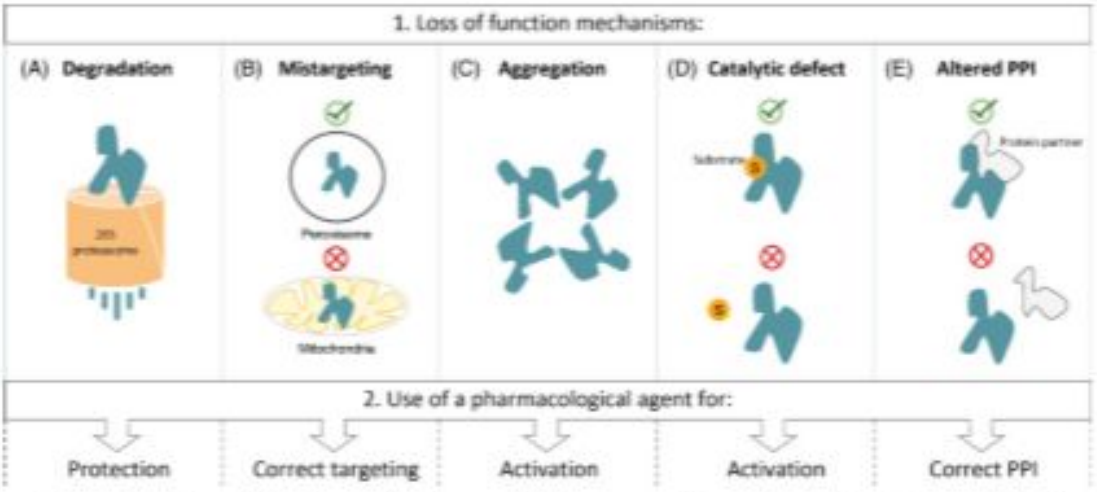


Figure 10.5 ***Loss-of-function mechanisms and the corresponding action of the pharmacological agent.*** (A) Increased degradation activity. (B) Mistargeting into mitochondria. (C) Increased susceptibility to aggregate. (D) Catalytic activity is suppressed by a defect in the corresponding domain. (E) Protein partners interactions do not work properly.