

Desarrollo de un ensayo *in vitro* para la identificación de compuestos inhibidores de la actividad reductasa de la hAASS, diana terapéutica de la epilepsia dependiente de piridoxina

Development of an *in vitro* assay for the identification of compounds that inhibit reductase activity of hAASS, therapeutic target of pyridoxine dependent epilepsy

LUCÍA CABANAS TREVIN

TRABALLO DE FIN DE GRAO

CURSO ACADÉMICO
2021-2022



ÍNDICE

1. RESUMEN	4
2. PALABRAS CLAVE.....	4
3. INTRODUCCIÓN	6
3.1. Metabolismo degradativo de la L-lisina	6
3.2. Etiopatogenia de la epilepsia dependiente de piridoxina.....	8
3.3. Diagnóstico de la epilepsia dependiente de piridoxina	8
3.4. Tratamiento actual para la epilepsia dependiente de piridoxina	9
3.5. Alfa- Aminoacido Semialdehído Sintetasa Humana (hAASS): diana terapéutica en el tratamiento de la epilepsia dependiente de piridoxina.....	9
4. OBJETIVOS	10
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
5.1. Clonaje de hAASS-myc-His6 (pEF/Myc-His A)	11
5.2. Transformación y amplificación del plásmido pEF6/Myc-His A en bacterias competentes DH5 α	12
5.3. Purificación del plásmido pEF6/hAASS-myc-His6.....	12
5.4. Transfección de pEF6/hAASS-myc-His6 y expresión en células eucariotas HEK293T	14
5.5. Lisis celular	15
5.6. Purificación de la proteína recombinante hAASS-myc-His6	16
5.7. Electroforesis SDS-PAGE y tinción en gel	17
5.8. Confirmación de la actividad reductasa de la hAASS-myc-His6 purificada y dializada mediante ensayo de absorbancia.....	18
5.9. Ensayo de luminiscencia para screening de compuestos	18
6. RESULTADOS.....	20
6.1. Cuantificación del plásmido PEF6/hAASS-myc-His6.....	20
6.2. Transformación, amplificación y purificación del plásmido pEF6/hAASS-myc-His6.....	20
6.3. Transfección química de pEF6/hAASS-myc-His6 y expresión en células HEK293T	21

6.4.	Lisis celular y purificación de la proteína recombinante hAASS-myc-His6	21
6.5.	Confirmación de la presencia de hAASS-myc-His6 mediante electroforesis SDS-PAGE y tinción en gel	23
6.6.	Validación de la actividad reductasa de la hAASS-myc-His6 purificada.....	24
6.6.1.	Optimización del buffer de reacción y de la cantidad de enzima hAASS-myc-His6.....	24
6.6.2.	Optimización del tiempo de incubación, determinación del efecto de la BSA en la mezcla de reacción y análisis de la estabilidad enzimática a ciclos de congelación-descongelación	26
6.6.3.	Optimización de la concentración de NADPH	27
6.6.4.	Optimización de la concentración de L-lisina.....	28
6.7.	Acople de un ensayo luminiscente al ensayo de actividad reductasa de la hAASS-myc-His6	29
6.8.	Cálculo del parámetro estadístico de calidad Z' del ensayo de actividad de hAASS-myc-His6 (luminiscencia)	33
7.	DISCUSIÓN.....	35
8.	CONCLUSIONES	37
9.	BIBLIOGRAFÍA	38
10.	AGRADECIMIENTOS.....	40

1. RESUMEN

La epilepsia dependiente de piridoxina (EDP) es una enfermedad rara producida por la mutación en el gen *ALDH7A1* que codifica para la antiquitina (ATQ), una enzima que participa en el metabolismo degradativo de la L-lisina. El déficit de antiquitina produce una interrupción del catabolismo de dicho aminoácido, que se traduce en la acumulación de metabolitos tóxicos (responsables de la afectación cognitiva) y en el desequilibrio entre neurotransmisores inhibidores y excitadores (responsable de las crisis convulsivas). Las crisis convulsivas de esta enfermedad se consiguen tratar con piridoxina a dosis farmacológicas, sin embargo, hasta un 75% de los pacientes presentan problemas relacionados con el neurodesarrollo.

Dado que los compuestos neurotóxicos acumulados son los productos formados por la alfa aminoacido semialdehído sintetasa humana (hAASS), se ha desarrollado un ensayo de actividad reductasa *in vitro* con la finalidad de una posterior identificación de compuestos inhibidores. Para ello, a partir de un plásmido comercial clonado con el cDNA que codifica para la hAASS (previamente amplificado y purificado) se llevó a cabo la expresión de la proteína recombinante hAASS-myc-His6 en células HEK293T mediante un proceso de transfección química y se purificó en su forma activa mediante cromatografía de afinidad a Ni²⁺ y diálisis. Finalmente, se validó la actividad reductasa de la hAASS-myc-His6 mediante el desarrollo y optimización de un ensayo de absorbancia (monitorización del consumo de Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato o NADPH), al que se acopló un ensayo de detección luminiscente para evitar interferencias de compuestos coloreados y aumentar la sensibilidad.

2. PALABRAS CLAVE

Epilepsia dependiente de piridoxina, L-lisina, déficit cognitivo, hAASS, reductasa, inhibidores.

ABSTRACT

Pyridoxine dependent epilepsy (PDE) is a rare disease caused by the mutation in *ALDH7A1* gene which encodes for antiquitin (ATQ), an enzyme that participates in L-lysine degradative metabolism. Antiquitin deficiency produces catabolism interruption of aforementioned aminoacid, which leads to

the accumulation of toxic metabolites (responsible for cognitive affectation) and the imbalance between inhibitory and excitatory neurotransmitters (responsible for convulsive crisis). The convulsive crisis of this disease can be treated with pharmacologic doses of pyridoxine nevertheless, up to 75% of patients show problems related with neurodevelopment.

Due to neurotoxic compounds accumulated are the products formed by human alpha aminoadipic semialdehyde synthase (hAASS), a reductase activity in vitro assay has been developed with the purpose of the later identification of inhibitor compounds. For this, a commercial plasmid was cloned with cDNA which codifies for hAASS (previously amplified and purified), the recombinant protein hAASS-myc-His6 was expressed in HEK293T cells by a chemical transfection and purified in its active form through affinity chromatography to Ni²⁺ and dialysis. Finally, hAASS-myc-His6 reductase activity was validated by development and optimization of an absorbance assay (monitorization of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate or NADPH consumption), coupling a luminescent assay detection to avoid coloured compounds interferences and to increase sensitivity.

KEY WORDS

Pyridoxine dependent epilepsy, L-lysine, cognitive deficiency, hAASS, reductase, inhibitors.

3. INTRODUCCIÓN

La epilepsia dependiente de piridoxina (EDP) es una enfermedad genética autosómica recesiva, producida por la mutación en el gen *ALDH7A1* (5q31) que codifica para la α -aminoadípico semialdehído deshidrogenasa, también conocida como antiquitina (ATQ), que participa en el metabolismo degradativo de la L-lisina. Se trata de una enfermedad rara cuyos valores de prevalencia e incidencia no se conocen con exactitud (1,2); los datos más recientes estiman que la prevalencia se sitúa entre 1/20000 y 1/783000 nacidos vivos (1) y que la incidencia oscila entre 1/65000 y 1/250000 nacidos vivos. Según el Registro Internacional de la epilepsia dependiente de piridoxina, entre 2014 y 2021, se notificaron más de 130 casos de la enfermedad en todo el mundo (2).

La EDP cursa con crisis convulsivas que responden a dosis altas de piridoxina, pero son refractarias al tratamiento anticonvulsivante habitual. Actualmente se distinguen dos tipos de EDP en función del momento de inicio de los síntomas (3):

- Clásica: es la mayoritaria, se caracteriza por ser de aparición muy precoz, suele iniciarse en las primeras semanas o meses de vida y se manifiesta con convulsiones neonatales que pueden ir precedidas de un proceso de encefalopatía. Dichas convulsiones, refractarias al tratamiento antiepiléptico convencional, se consiguen tratar con piridoxina.
- Atípica: presenta un inicio más tardío pudiendo aparecer incluso durante la adolescencia. Inicialmente responde al tratamiento antiepiléptico convencional, pero con el tiempo desarrolla resistencia al mismo.

En ambos casos, la severidad de los síntomas está condicionada por la edad de inicio de estos y el retraso en el diagnóstico. Así pues, una aparición prematura de los síntomas se relaciona con un peor pronóstico de la enfermedad y un retraso en el diagnóstico con un mayor déficit cognitivo (3,4).

3.1. Metabolismo degradativo de la L-lisina

La L-lisina presenta dos vías degradativas, la vía de la sacaropina y la vía del ácido pipercolico (PA) (Figura 1). La ruta de la sacaropina está mediada por la α -aminoadipato semialdehído sintetasa (AASS), que presenta dos centros catalíticos (la L-lisina cetoglutarato reductasa o LKR y la sacaropina deshidrogenasa o SDH) encargados de los dos primeros pasos degradativos de la L-lisina. El dominio LKR cataliza la condensación de la L-lisina con el cetoglutarato para formar sacaropina, que a través del dominio SDH forma el ácido 6-semialdehído 2-aminoadípico (AASA) y L-glutamato. La ruta del ácido

pipecólico no está totalmente caracterizada a nivel molecular, ya que no se conoce cuál es la enzima responsable de la transformación de la L-lisina en ácido 2-oxo-6-amino caproico, que se transforma espontáneamente en 1-piperidina-2-carboxilato (P2C). Este último, por acción de una enzima citosólica forma el ácido pipecólico (PA) que por medio de una peroxidasa es convertido a piperidina-6-carboxilato (P6C), la forma cíclica del AASA. Por lo tanto, ambas vías convergen en la formación de AASA y P6C, que se encuentran en equilibrio; y el AASA es metabolizado por la ATQ a α -ácido aminoadípico (AAA), que sufre una serie de reacciones metabólicas hasta formar el acetyl-CoA capaz de entrar en el Ciclo de Krebs (5).

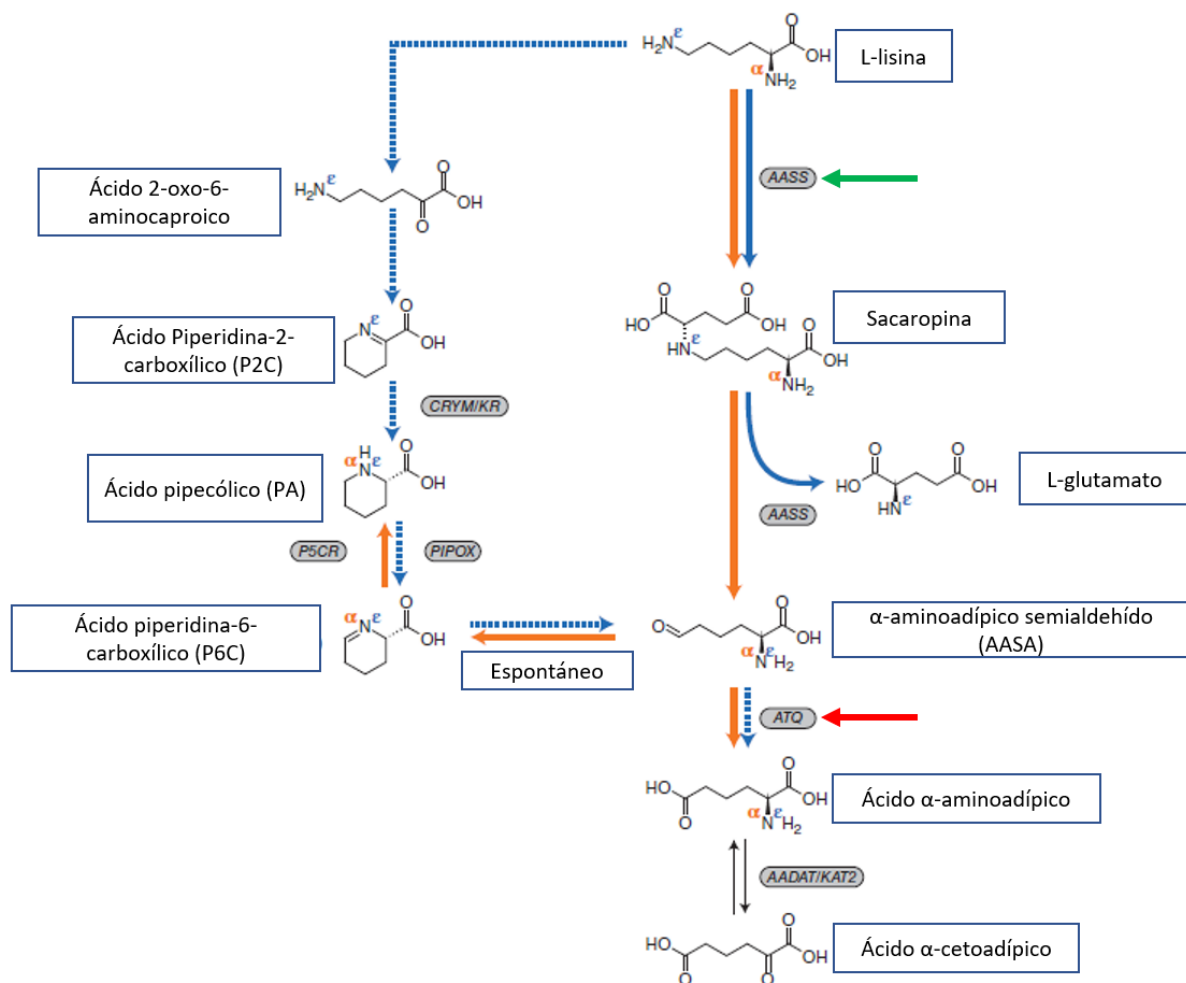


Figura 1 Esquema de las rutas degradativas de la L-lisina en el organismo destacando la actividad biológica de las dos enzimas relacionadas con la EDP -la AASS como diana terapéutica (flecha verde) y la ATQ como enzima deficiente (flecha roja)-. Modificado de: (6).

La ruta de la sacaropina se considera mayoritaria, incluso en el Sistema Nervioso Central (SNC) donde inicialmente se creía que era mayoritaria la ruta del PA. Esta creencia se debía a la imposibilidad de

detectar la sacaropina a este nivel, a una expresión inferior de la AASS en el SNC respecto a otros tejidos y a la presencia de niveles elevados de PA en las células del SNC. Actualmente, se ha demostrado que la sacaropina se convierte rápidamente en AASA impidiendo su detección a nivel del SNC y que el PA no solo se forma por la ruta del ácido pipecólico, sino también a través de la ruta de la sacaropina (6).

En la epilepsia dependiente de piridoxina el déficit de ATQ, provoca la interrupción del metabolismo de la L-lisina a nivel del AASA y P6C, cuya acumulación junto a otros metabolitos es responsable de los principales signos y síntomas de la enfermedad (3).

3.2. Etiopatogenia de la epilepsia dependiente de piridoxina

La mutación en el gen que codifica para la ATQ conlleva a la acumulación de AASA, P6C, L-glutamato y PA en el organismo. El P6C acumulado reacciona con el piridoxal 5'-fosfato (PLP) y lo inactiva, generando una depleción secundaria de PLP y un desequilibrio entre el GABA (neurotransmisor inhibitor) y el L-glutamato (neurotransmisor excitador), que se propone como el origen de las crisis convulsivas (3,7). No obstante, esto solo justifica la aparición de las convulsiones, no explica el origen de los problemas en el neurodesarrollo ni en la movilidad, que también están presentes en esta patología.

Recientemente, los problemas cognitivos han sido relacionados con alteraciones en el metabolismo energético producidas por el déficit de ATQ y PLP. En este sentido, las rutas degradativas de la L-lisina dejan de generar acetil-CoA que es el principal sustrato del Ciclo de Krebs; y la disminución de la síntesis de GABA debido a la carencia de PLP se traduce en una disminución de los niveles de succinato, que está implicado en la homeostasis energética. Además, la reducción de los sustratos disponibles para la producción de energía genera, en último término, alteraciones en la cadena de transporte de electrones y muerte neuronal prematura, que se ha planteado como hipótesis de los problemas en el neurodesarrollo (8).

3.3. Diagnóstico de la epilepsia dependiente de piridoxina

El diagnóstico de la epilepsia dependiente de piridoxina se basa en la determinación analítica de los metabolitos degradativos de la L-lisina (AASA y P6C) en sangre u orina. Dicha determinación se hace por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS), que permite hacer una cuantificación simultánea de los distintos compuestos. El principal inconveniente de esta técnica es

que no está disponible en todos los laboratorios y las muestras biológicas podrían dañarse en su transporte hasta el laboratorio de análisis. Sin embargo, las muestras secas de sangre y orina (más estables que las muestras convencionales) pueden ser la solución al problema (9).

Recientemente se ha descrito un nuevo compuesto de origen desconocido que también podría ser útil como biomarcador, el 6-oxo-pipecolato. Este compuesto presenta la ventaja de ser estable a temperatura ambiente pero su sensibilidad y especificidad no se han podido demostrar (4).

3.4. Tratamiento actual para la epilepsia dependiente de piridoxina

El tratamiento actual para la epilepsia dependiente de piridoxina se basa en la administración de piridoxina, en la restricción del aporte de lisina en la dieta y en la suplementación de arginina (“terapia triple”). La monoterapia con piridoxina, molécula que una vez en el organismo se transforma en PLP (su forma activa) (7), es efectiva para el tratamiento de las convulsiones, pero hasta un 75% de los pacientes con respuesta positiva al control de las convulsiones, presenta problemas cognitivos puesto que no se consiguen disminuir los niveles de P6C y AASA (compuestos neurotóxicos). En consecuencia, es necesario restringir el aporte dietético de L-lisina, mediante el empleo de fórmulas proteicas exentas de L-lisina, para disminuir la formación de P6C y AASA; y administrar suplementos de L-arginina que mediante un mecanismo competitivo impide el acceso de la L-lisina al SNC a través de los transportadores de aminoácidos catiónicos mCAT1 y mCAT3 (3,10).

3.5. Alfa- Aminoacido Semialdehído Sintetasa Humana (hAASS): diana terapéutica en el tratamiento de la epilepsia dependiente de piridoxina

La hAASS es la proteína responsable de las dos primeras etapas del catabolismo de la L-lisina; se expresa en numerosos tejidos del organismo, pero se encuentra mayoritariamente en el hígado y actúa a nivel mitocondrial (3).

Se trata de una enzima bifuncional que presenta 926 aminoácidos, una estructura en α -hélice y cadena plegada β y dos dominios: el L-lisina α -cetoglutarato reductasa (LKR) en el extremo N-terminal y el dominio sacaropina deshidrogenasa (SDH) en el extremo C-terminal; ambos separados por un grupo de tres aminoácidos (452-455) (Figura 2) (11).

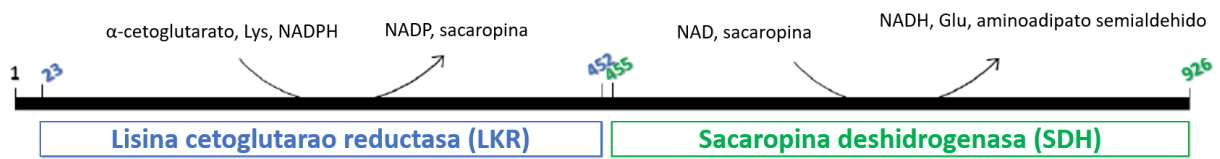


Figura 2 Esquema estructural de la hAASS diferenciando los dos centros catalíticos LKR y SDH. Modificado de: (11).

Dada la ausencia de un tratamiento específico para la epilepsia dependiente de piridoxina (3,10) y teniendo en cuenta que los niveles elevados de L-lisina en el organismo son tolerados (12), en este trabajo se propuso el desarrollo de un ensayo *in vitro* para la realización de un *screening* de compuestos inhibidores de la actividad LKR de la hAASS evitando la acumulación de intermediarios neurotóxicos procedentes del catabolismo de la L-lisina mediante la inactivación de dicha enzima.

4. OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo fue desarrollar un método de cuantificación de la actividad de la hAASS que permita identificar inhibidores de esta diana.

Los objetivos específicos de este trabajo fueron:

- Producir y purificar la hAASS recombinante activa.
- Desarrollar un ensayo de cuantificación de la actividad de hAASS *in vitro* para el *screening* de compuestos inhibidores de la actividad LKR de la diana.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Clonaje de hAASS-myc-His6 (pEF/Myc-His A)

El vector de expresión pEF6/myc-His A previamente clonado con el cDNA que codifica para la hAASS, fue cedido por el Duve Institute, Bruselas.

El plásmido pEF6/Myc-His A ha sido diseñado para la producción de proteínas recombinantes en líneas celulares de mamíferos con alta tasa de replicación (HeLa o HEK293T). Posee un promotor de expresión constitutiva en eucariotas (hEF-1 α) y el extremo C-terminal del cDNA inserto contiene dos secuencias que codifican para dos tags (myc e His6) que facilitan la purificación y la detección de la proteína de interés. Además, presenta un gen de resistencia a la ampicilina que facilitará la selección de las bacterias transformadas (Figura 3) (13).

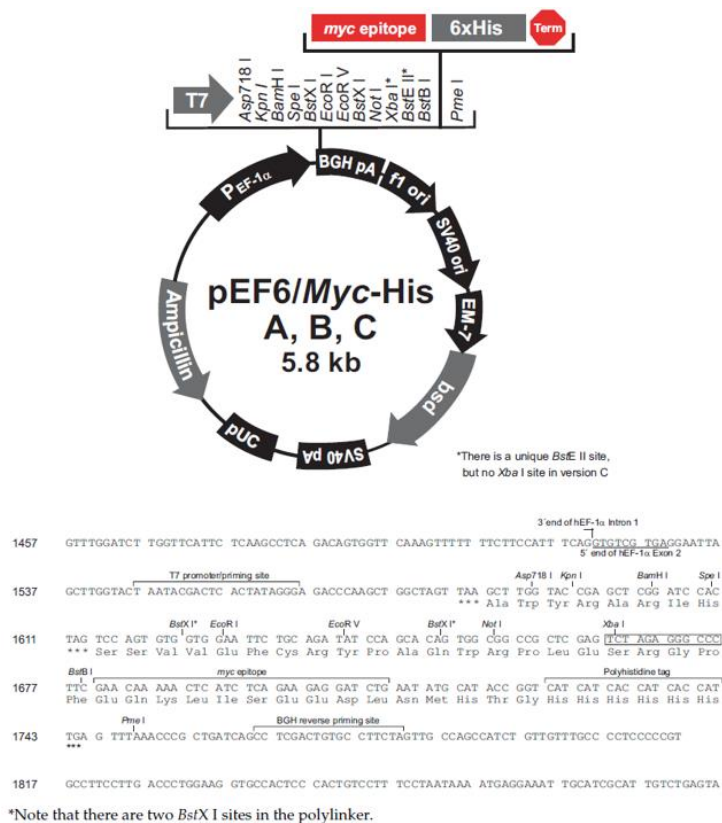


Figura 3 Esquema del vector de expresión pEF6/Myc-HisA (superior) y secuencia nucleotídica que muestra el sitio de clonación múltiple y los tags que añade a la proteína de interés (inferior) (13).

5.2. Transformación y amplificación del plásmido pEF6/Myc-His A en bacterias competentes DH5α

Para la amplificación del vector de expresión pEF6/Myc-His A se empleó la cepa K-12 de *Escherichia coli* DH5α (C2987P, *New England Biolabs*), altamente receptiva a la internalización de DNA exógeno. Se trata de bacterias competentes, no patógenas, dotadas de resistencia al bacteriófago T1, con baja recombinación del DNA clonado y sin actividad endonucleasa I.

Para la transformación se descongeló una alícuota (25 µL) de *E. coli* DH5α durante 10 minutos en hielo. Seguidamente se añadieron 30 ng de DNA plasmídico a las bacterias, se mezcló por pipeteo y se incubó en hielo durante 30 minutos. A continuación, se incubó durante 30 segundos a 42°C y de nuevo en hielo durante 5 minutos para producir el choque térmico. Se añadieron 250 µL de medio SOC (1% triptona, 0.5% extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucosa) y se incubó en agitación a 250 r.p.m. durante 1 hora a 37°C. Paralelamente, se precalentaron placas de medio LB (1% triptona, 0.5% extracto de levadura, 0.17 M NaCl, 1.5% agar) suplementado con ampicilina (100 µg/mL) a 37°C. Finalmente, se centrifugó el cultivo bacteriano a 3000 r.p.m. durante 3 minutos, se eliminaron 200 µL del sobrenadante, se resuspendió el pellet en los aproximadamente 75 µL restantes y se sembraron 5 y 10 µL en cada placa de cultivo respectivamente y se incubó a 37°C durante toda la noche.

Al día siguiente se comprobó el crecimiento bacteriano, se inoculó una colonia en 1 L de medio LB (1% triptona, 0.5% extracto de levadura, 0.17 M NaCl) suplementado con ampicilina (100 µg/mL) y se incubó a 37°C y 200 r.p.m. durante 24 h.

Tras la amplificación del plásmido, se centrifugó el cultivo a 5000 g durante 10 minutos a 4°C; el pellet obtenido se sometió al proceso de purificación de manera inmediata o bien se congeló a -80°C para su conservación y posterior uso.

5.3. Purificación del plásmido pEF6/hAASS-myc-His6

Para la purificación del plásmido pEF6/hAASS-myc-His6 se utilizó el kit comercial Nucleo Bond Xtra Midi EF (740420.50, *Macherey-Nagel*), que se basa en la unión de los grupos fosfato de carga negativa del DNA plasmídico a los grupos metil-amino-etanol (MAE) de la resina de intercambio aniónico, siguiendo las instrucciones del fabricante (Figura 4) (14).

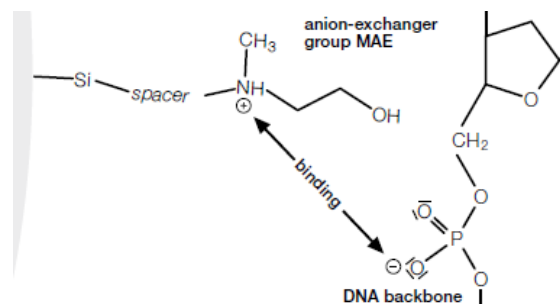


Figura 4 Esquema de la interacción entre el grupo fosfato del DNA y el grupo MAE de la resina de intercambio aniónico (14).

El pellet bacteriano se resuspendió en el Buffer RES-EF (740386.1000, *Macherey-Nagel*). A continuación, se añadió el Buffer LYS-EF (740387.1000, *Macherey-Nagel*) precalentado a 37°C y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos, provocando la lisis celular.

Una vez preparado el lisado celular, se procedió en paralelo al equilibrado de la columna con 15 mL del Buffer EQU-EF (740389.1000, *Macherey-Nagel*) humectando todo el filtro; se añadió el Buffer NEU-EF (740388.1000, *Macherey-Nagel*) al lisado para provocar la precipitación del DNA bacteriano, se homogeneizó por inversión y se incubó en hielo durante 5 minutos. A continuación, se cargó la columna con el lisado previamente homogeneizado, se añadieron 5 mL de Buffer FIL-EF (740390.600, *Macherey-Nagel*) sobre el filtro para desplazar la muestra retenida por el mismo hacia la columna; se descartó el filtro y se realizaron 2 lavados. El primer lavado se realizó con 35 mL de Buffer ENDO-EF (740391.1000, *Macherey-Nagel*) y el segundo con 15 mL de WASH-EF (740392.1000, *Macherey-Nagel*).

La elución se llevó a cabo con 5 mL de Buffer ELU-EF (740393.900, *Macherey-Nagel*) precalentado a 50°C para aumentar el rendimiento del proceso. A continuación, se añadieron 3.5 mL de isopropanol al eluido y se centrifugó a 5525 g durante 1 h y 30 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante, se añadió 70% etanol libre de endotoxinas (2 mL), se centrifugó de nuevo a 5525 g a temperatura ambiente durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se secó el pellet a 37°C durante 5 minutos. Finalmente, se reconstituyó en 250 µL de agua libre de endotoxinas (H₂O-EF).

La concentración de DNA plasmídico obtenida se determinó en el Nanodrop y posteriormente se congeló dicho eluido (-80°C).

5.4. Transfección de pEF6/hAASS-myc-His6 y expresión en células eucariotas HEK293T

Para la expresión de la proteína hAASS-myc-His6 se empleó la línea celular HEK293T, células embrionarias de riñón humano. Son células fácilmente transfectables y presentan una alta tasa de producción de proteínas recombinantes, lo que las hace óptimas para la expresión transitoria de genes (15).

Los procesos aquí descritos se llevaron a cabo en una cabina de flujo laminar vertical en condiciones asépticas.

Las células HEK293T se cultivaron en un medio compuesto por MEM (M4655, *Sigma-Aldrich*), 10% suero fetal bovino (F9665, *Sigma-Aldrich*), 1% de aminoácidos no esenciales (M7145, *Sigma-Aldrich*), 1 mM de piruvato de sodio (S8636, *Sigma-Aldrich*) y 1% de penicilina-estreptomicina (P0781, *Sigma-Aldrich*), a 37°C en atmósfera humidificada con 5% de CO₂. Se realizaron subcultivos cada 48-72 h al alcanzar una confluencia del 60-70% y como disgregante enzimático se utilizó tripsina (T3924, *Sigma-Aldrich*).

Se emplearon un total de 20 placas p150 mantenidas a 37°C y cuando se alcanzó el 70% de confluencia, se aspiró el medio de cultivo y se sustituyó por 20 mL de medio OPTI-MEM® 1x (31985062, *Gibco*) en cada placa.

Para la transfección de las células HEK293T, se empleó el kit comercial jetPEI® (101000020, *Polyplus*) siguiendo el protocolo directo descrito por el fabricante. El reactivo de transfección es un derivado de la polietilenimina que forma un complejo catiónico con el DNA plasmídico, capaz de interactuar con la membrana celular (cargada negativamente) y de formar un endosoma que libera el material genético al citosol para su posterior penetración en el núcleo celular (16).

Se empleó una ratio 1 (µg DNA plasmídico): 2 (µL reactivo de transfección). Concretamente, se emplearon 30 µg de DNA plasmídico por placa con 0.5 mL por placa de NaCl 150 mM en un tubo falcon. Paralelamente, en otro tubo falcon, se mezclaron 60 µL de reactivo de transfección por placa con 0.5 mL por placa de NaCl 150 mM. La mezcla con el reactivo de transfección se adicionó al tubo que contenía la solución salina de DNA plasmídico, se agitó en vórtex durante 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos para permitir la formación de los complejos de transfección (Figura 5). Finalmente, se adicionó 1 mL de la mezcla por placa y se incubó durante 48 h a 37°C en atmósfera humidificada con 5% de CO₂.

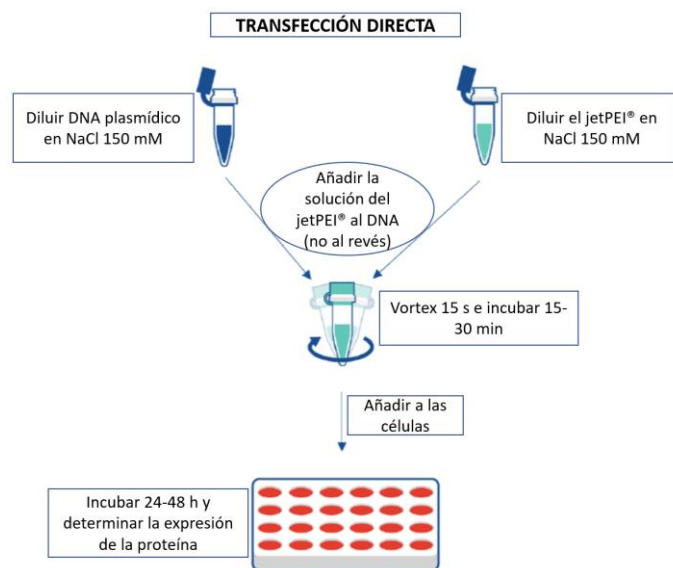


Figura 5 Esquema del proceso de transfección directa llevada a cabo con el reactivo jetPEI®. Modificado de: (16).

Simultáneamente, se llevó a cabo la transfección del pEF6/GFP-myc-His6 que codifica para una proteína de fluorescencia verde (GFP) con la finalidad de confirmar la eficiencia del proceso. A las 24 y 48 h, se realizó un seguimiento del proceso de transfección y expresión mediante microscopía de fluorescencia.

Transcurridas las 48 h, se procedió a aspirar el medio de cultivo (se conservó a -80°C para análisis posteriores, en caso de ser necesarios); se añadieron 10 mL de buffer fosfato salino (PBS) a cada placa y se disgregaron las células con una espátula. A continuación, se centrifugó a 2000 r.p.m. durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet celular se conservó a -80°C .

5.5. Lisis celular

Para la lisis se descongeló el pellet celular y se resuspendió en 40 mL de buffer de lisis (25 mM HEPES, cOmplete™ Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (11836170001, Roche), 0.5 mM PMSF). A continuación, se sometió a un choque térmico realizando tres ciclos de congelación con nitrógeno líquido y descongelación a 37°C . Posteriormente, se incubó en hielo durante 30 minutos en presencia de DNAasa (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y MgCl_2 (25 mM). Transcurrido ese tiempo, se centrifugó la muestra a 16100 g durante 20 minutos a 4°C , se recogió el sobrenadante en un tubo falcon y se tomó una alícuota para cuantificar la concentración proteica. La cantidad restante se dividió en alícuotas que se conservaron a -80°C hasta su utilización.

Para la cuantificación de la proteína se empleó el kit comercial DC Protein Assay (500-0111, *BioRad*) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, este kit se basa en un método colorimétrico: se forman complejos entre el tartrato de cobre y las proteínas en un medio alcalino, que reducen el reactivo de Folin generando un color azulado que se detectó mediante espectrofotometría UV ($\lambda=750$ nm) en el lector de placas multipocillo Tecan INFINITE PRO M1000. El valor de absorbancia medio obtenido para la muestra se interpoló a partir de una recta de calibrado realizada previamente y se obtuvo la concentración proteica del lisado.

5.6. Purificación de la proteína recombinante hAASS-myc-His6

Tras determinar la concentración proteica del lisado, se procedió a la purificación de la hAASS-myc-His6 mediante una cromatografía de afinidad en el equipo ÄKTA start (29022094, *Cytiva*) (Figura 6) empleando una columna de níquel HisTrap™ FF Crude de 1 mL (11000458, *Cytiva*). El flujo se ajustó a 1 mL/min y se monitorizó el proceso a 280 nm con el detector UV.

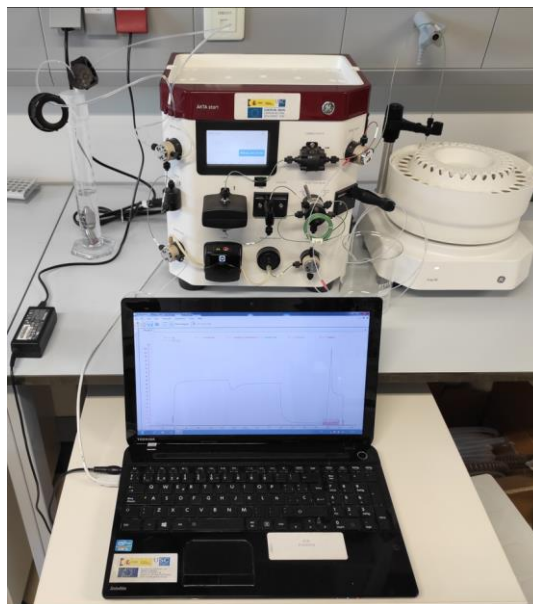


Figura 6 Equipo ÄKTA start automatizado empleado en la purificación mediante cromatografía de afinidad a Ni^{2+} de la hAASS-myc-His6.

En primer lugar, se descongeló el lisado, se filtró a través de un filtro de $0.22 \mu\text{m}$ y se diluyó 1:4 en el buffer de binding y equilibrado (Tris 25 mM, pH 8, NaCl 150 mM). La columna se equilibró con 5

volúmenes de buffer y a continuación se cargó la muestra (lisado). La fracción no retenida se almacenó a -80°C para análisis posteriores.

Seguidamente se realizó un lavado con 15 volúmenes de buffer de equilibrado y una elución isocrática con 5 volúmenes de buffer de elución (Tris 25 mM, pH 8, NaCl 150 mM, imidazol 500 mM). El imidazol compite con los grupos histidina de la hAASS-myc-His6 y la desplaza de su unión a la columna, recolectándose las tres fracciones eluidas correspondientes al pico de absorbancia a 280 nm.

Para la eliminación del imidazol y las sales se empleó el kit comercial de diálisis Pur-A-Lyzer™ Maxi 12000 (PURX12015, *Sigma-Aldrich*), que consta de tubos de diálisis con una membrana de tamaño de poro de 12 kDa, que permitieron la salida de las sales y el imidazol al medio, pero retuvieron la proteína de interés. La muestra se dializó frente 1 L de PBS durante 24 h, a 4°C con agitación magnética sustituyéndose por PBS fresco cada 8 h. Finalmente, se cuantificó la proteína y se almacenó en alícuotas a -80°C para evitar ciclos congelación-descongelación.

5.7. Electroforesis SDS-PAGE y tinción en gel

Para confirmar la presencia de la proteína hAASS-myc-His6 en la muestra, se realizó una electroforesis SDS-PAGE que separó a las proteínas en función de su peso molecular. Se analizó el lisado previo a la purificación por afinidad y las tres fracciones eluidas purificadas y dializadas. Brevemente, se tomó una alícuota de 20 µg de proteína de cada muestra y se les añadió el tampón de carga NuPAGE™ LDS (4X) (NP0007, *Invitrogen™*). Se calentaron a 95°C durante 5 minutos para facilitar la desnaturalización proteica y se microcentrifugaron durante 30 segundos. A continuación, se preparó el dispositivo de electroforesis Mini Gel Tank (A25977, *ThermoFisher Scientific*) empleando el gel comercial de 12 pocillos Bolt™ 4-12%, Bis-Tris, 1.0 mm (NW04120BOX, *Invitrogen™*) y buffer de electroforesis NuPAGE™ MES SDS Running Buffer (1X) (NP0002, *Invitrogen™*). Seguidamente, se cargaron las muestras y 10 µL del marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder (26616, *Thermo Scientific*) en sus respectivos pocillos y se corrió la electroforesis a 165 V durante 30 minutos.

Una vez finalizada la electroforesis, se fijaron las proteínas del gel con una mezcla de ácido acético (10%) y metanol (40%) durante 15 minutos en agitación. A continuación, se realizaron 2 lavados con agua destilada durante 5 minutos, también en agitación. Finalmente, se descartó el agua destilada y se procedió a la tinción del gel con 20 mL de Quick Coomassie Stain (NB-45-0078, *Neo Biotech*) incubándolo a temperatura ambiente y en agitación hasta el día siguiente. Posteriormente, se lavó con agua ultrafiltrada para eliminar los restos del reactivo de tinción.

5.8. Confirmación de la actividad reductasa de la hAASS-myc-His6 purificada y dializada mediante ensayo de absorbancia

La validación de la actividad enzimática de la proteína hAASS-myc-His6 se llevó a cabo mediante un ensayo de reducción monitorizando la variación de absorbancia en modo cinético (17,18).

En la reacción se emplearon α -cetoglutarato y L-lisina como sustratos; y como cofactor se utilizó NADPH. El consumo de NADPH -y como consecuencia la disminución de absorbancia a $\lambda=340$ nm- permite determinar la presencia de enzima activa en la mezcla de reacción (Figura 7).

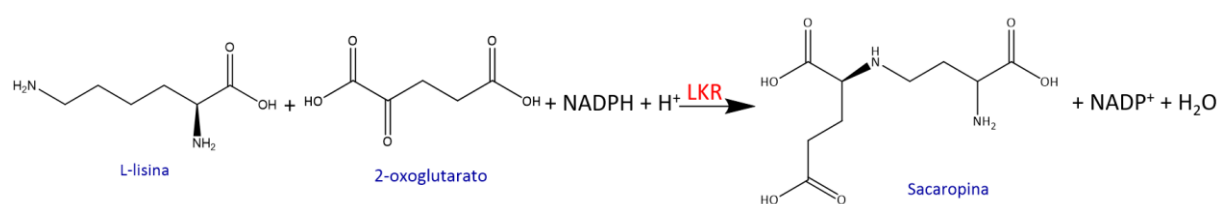


Figura 7 Esquema de la reacción catalizada por el dominio LKR de la hAASS.

En una placa transparente de 384 pocillos (781101, Greiner) se pipeteó el buffer de ensayo 50 mM HEPES, pH=7.35; a continuación, se añadió α -cetoglutarato a concentración final 4 mM, NADPH a concentración final 0.4 mM y la proteína hAASS-myc-His6 (5 μ g). Finalmente se añadió L-lisina a una concentración final de 10 mM en un volumen final de reacción 50 μ L.

La lectura de la absorbancia se realizó en el lector Tecan INFINITE PRO M1000 a 340 nm durante 2 h a 37°C.

5.9. Ensayo de luminiscencia para screening de compuestos

Para evitar las interferencias de compuestos coloreados y aumentar la sensibilidad del ensayo en el cribado de moléculas se implementó de forma adicional al ensayo de absorbancia un ensayo de luminiscencia; siendo necesario transferir el contenido de la placa multipocillo transparente a una placa multipocillo negra de fondo transparente (781096, Greiner) incubándola 20 minutos a temperatura ambiente.

Para el ensayo de luminiscencia se empleó el kit NAD(P)H-Glo™ Detection System (G9062, Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit permite la detección luminiscente del NADPH

presente en una mezcla (Figura 8). Brevemente, se descongeló el kit a temperatura ambiente, se reconstituyó el liofilizado de luciferina con el buffer de reacción y se agitó por inversión hasta obtener una solución homogénea. A continuación, se preparó el reactivo de detección completo necesario para realizar una mezcla 1:1 con los volúmenes de muestra en los pocillos (50 μ L) de la placa negra de fondo transparente (781096, *Greiner*). Para ello, se añadió el volumen correspondiente de reductasa (1:200) y de sustrato (1:200) al buffer de reacción.

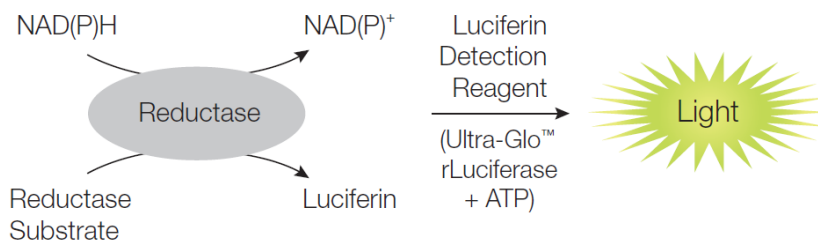


Figura 8 Esquema de la reacción fundamental del NAD(P)H-Glo™ Detection System (19).

Finalmente, se realizó la lectura cinética de la luminiscencia a temperatura ambiente durante una hora en el lector multipocillo HAMAMATSU.

6. RESULTADOS

6.1. Cuantificación del plásmido pEF6/hAASS-myc-His6

El plásmido cedido por el Duve Institute de Bruselas, fue cuantificado y se determinó su pureza en un NanoDrop™. La concentración obtenida fue de 0.9 µg/µL y los índices de pureza obtenidos: $A_{260}/A_{280}=1.88$ y $A_{260}/A_{230}=2.06$. El primero de ellos (1.7-2) fue indicativo de que la muestra está libre de contaminación proteica, así como de otros ácidos nucleicos y el segundo (>1.8) indicó que la concentración de sales, fenoles y carbohidratos en la muestra es baja.

6.2. Transformación, amplificación y purificación del plásmido pEF6/hAASS-myc-His6

Una vez transformadas las células competentes de *Escherichia coli* DH5-α (cepa K-12) por choque térmico, se sembraron en placas de agar LB-ampicilina (100 µg/mL), se incubaron a 37°C hasta el día siguiente y se obtuvieron colonias individuales y diferenciadas (Figura 9).

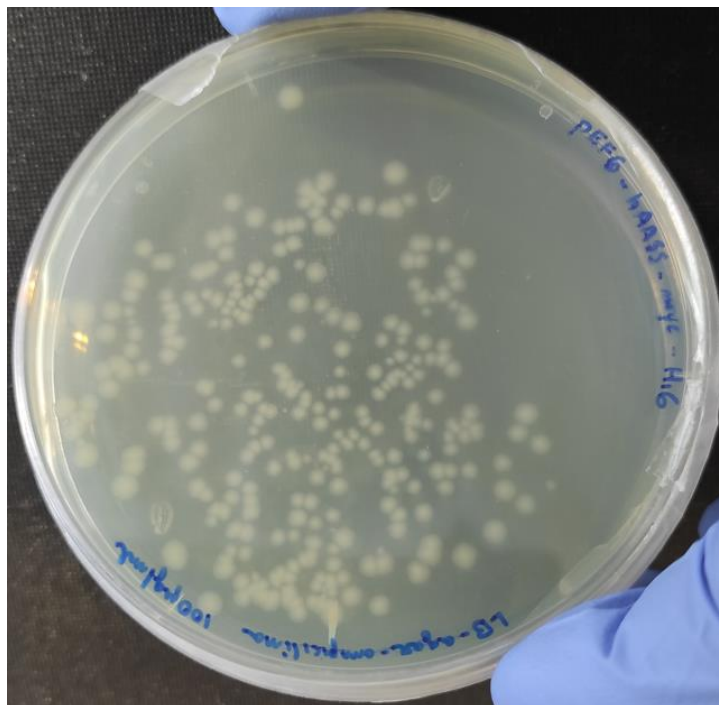


Figura 9 Placa de agar-LB suplementada con ampicilina (100 µg/mL) donde se observan colonias individuales y diferenciadas de *E.coli* DH5-α transformadas con el vector de expresión pEF6/hAASS-myc-His6.

Una de las colonias se inoculó en medio líquido LB-ampicilina (100 µg/mL) y se incubó durante 24 h a 37°C. Transcurrido ese tiempo se centrifugó el cultivo para sedimentar el pellet bacteriano y se purificó

el plásmido pEF6/hAASS-myc-His6. La concentración de DNA plasmídico obtenida fue de 4.37 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y los índices de pureza fueron: $A_{260}/A_{280} = 1.91$ y $A_{260}/A_{230} = 2.02$, resultando en unos parámetros adecuados para su posterior transfección en células eucariotas.

6.3. Transfección química de pEF6/hAASS-myc-His6 y expresión en células HEK293T

Las células HEK293T con una confluencia próxima al 70% fueron transfectadas con el plásmido pEF6/hAASS-myc-His6 y se incubaron a 37°C y 5% de CO_2 durante 48 h para la expresión proteica. En paralelo, las células HEK293T fueron transfectadas en condiciones similares con un plásmido de expresión de proteína de fluorescencia verde (pEF6/GFP-myc-His6) para comprobar la eficacia del proceso. Transcurridas 48 h se observó fluorescencia GFP en las células transfectadas con el vector de expresión fluorescente indicando que las condiciones de transfección en esta línea celular resultaron adecuadas (Figura 10).

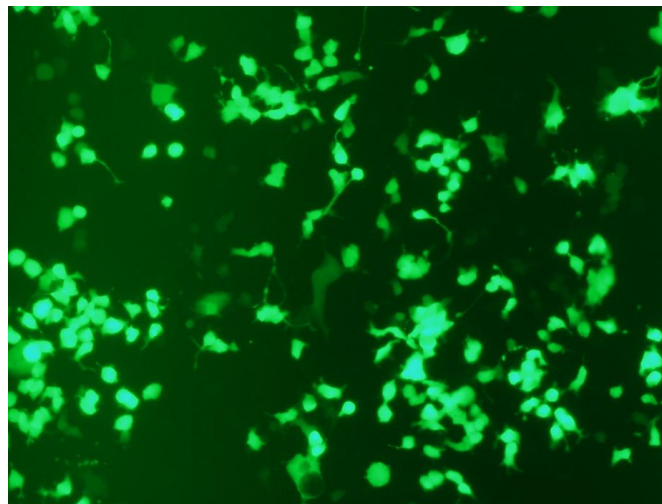


Figura 10 Imagen de microscopía de fluorescencia de células HEK293T transfectadas con el vector pEF6/GFP-myc-His6 expresando la proteína GFP.

6.4. Lisis celular y purificación de la proteína recombinante hAASS-myc-His6

A continuación, las células transfectadas se recolectaron en PBS, se centrifugó la suspensión celular y se conservó el pellet a -80°C para su posterior lisis mediante choque térmico. La concentración proteica obtenida en el lisado celular fue de 2.75 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y la cantidad total de proteína fue de 110 mg (40 mL).

La purificación de la proteína hAASS-myc-His6 mediante cromatografía de afinidad se llevó a cabo en el equipo automatizado ÄKTA start utilizando una columna de níquel HisTrap™ FF Crude de 1 mL (diseñadas para la retención de proteínas con tags de His6).

La elución isocrática se realizó con buffer Tris 25 mM, pH 8, NaCl 150 mM, imidazol 500 mM y se obtuvo un pico de absorbancia a 280 nm correspondiente a las fracciones eluidas 5, 6 y 7 como se puede observar en la figura 11.

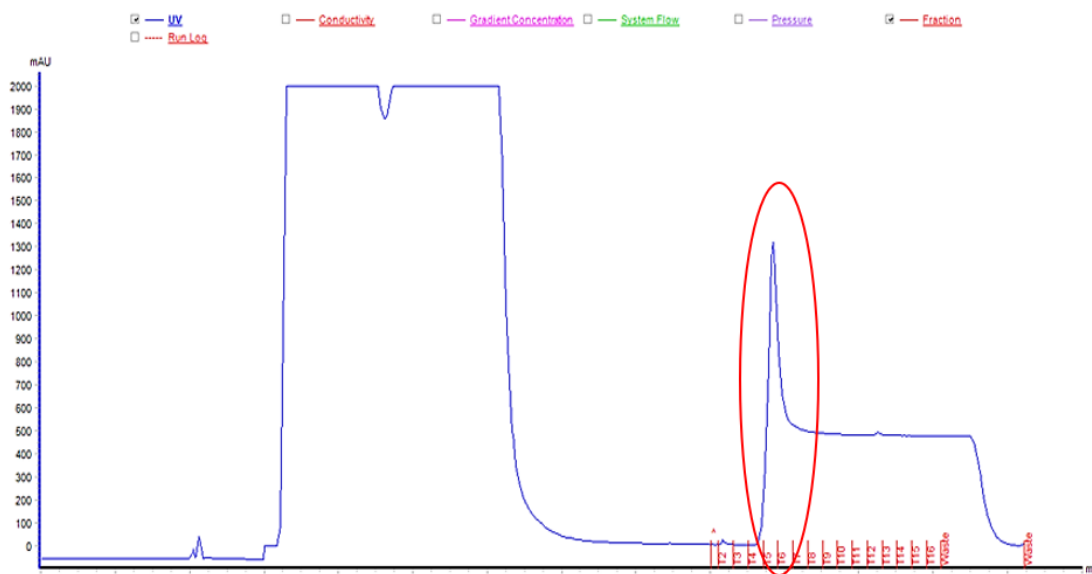


Figura 11 Cromatograma de afinidad obtenido a 280 nm durante la purificación de la proteína recombinante hAASS-myc-His6 a partir de un lisado de células HEK293T transfectadas -se señala el pico de elución correspondiente a las fracciones 5, 6 y 7-.

Las fracciones 5, 6 y 7 se sometieron a un proceso de diálisis durante 24 h frente a PBS para eliminar el exceso de sales e imidazol de la muestra eluida.

Una vez dializada, se cuantificó la concentración proteica: 1.59 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, resultando en un total de 3.975 mg de hAASS-myc-His6 (2.5 mL de muestra). Además, se cuantificó la proteína en la fracción no retenida y se obtuvo una concentración de 0.72 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 28.8 mg en 40 mL del no retenido. El rendimiento de la purificación fue de un 3.61%.

6.5. Confirmación de la presencia de hAASS-myc-His6 mediante electroforesis SDS-PAGE y tinción en gel

Para confirmar la presencia de hAASS-myc-His6 en las fracciones dializadas se realizó una electroforesis SDS-PAGE. Se analizaron las siguientes muestras: el lisado transfectado y la proteína purificada y dializada (fracciones 5,6 y 7); y se cargó una alícuota de 20 µg de proteína de cada una de ellas.

En los resultados obtenidos tras la tinción del gel durante 24 h se aprecia una banda proteica teñida entre los marcadores de peso molecular de 100 y 130 kDa que confirmó la presencia de la proteína de interés -peso molecular teórico de 112 kDa (17,18)- en las fracciones purificadas y dializadas (Figura 12).

El resto de las bandas (40, 55 y 60 kDa) presentes en las fracciones analizadas podrían corresponderse con fragmentos procedentes de la proteólisis de la proteína hAASS-myc-His6 durante la lisis celular y su purificación o podría tratarse de otras proteínas copurificadas en el proceso.

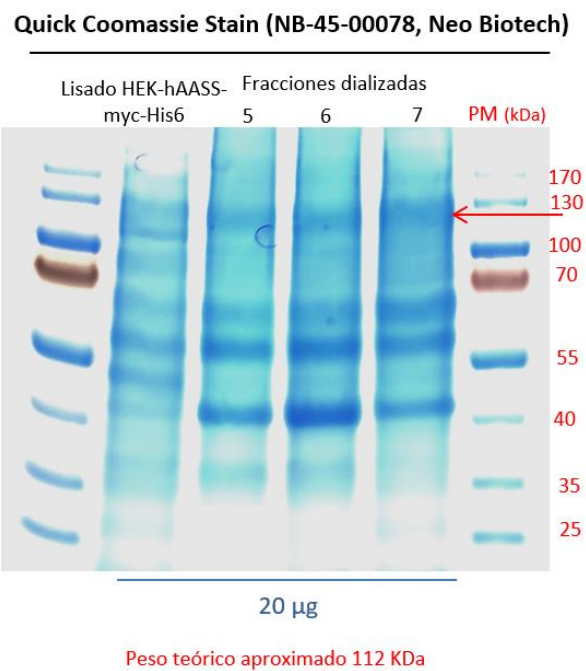


Figura 12 Gel de electroforesis SDS-PAGE teñido. La flecha señala la banda correspondiente a la hAASS-myc-His6 (112 kDa).

6.6. Validación de la actividad reductasa de la hAASS-myc-His6 purificada

La hAASS es una enzima bifuncional con actividad L-lisina α -cetoglutarato reductasa (LKR) y sacaropina deshidrogenasa (SDH). La actividad enzimática de interés específico a validar fue la primera: una reacción de condensación reductiva del α -cetoglutarato con la L-lisina para la formación de sacaropina y agua, empleando el NADPH como cofactor (Figura 13).

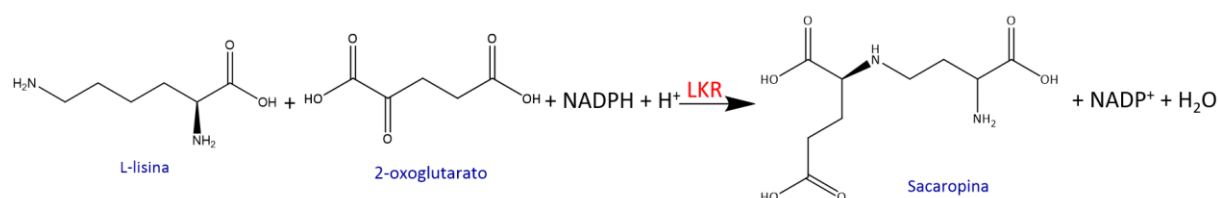


Figura 13 Esquema de la reacción catalizada por el dominio LKR de la hAASS.

La confirmación de la actividad LKR de la proteína hAASS-myc-His6 se basó en el método descrito por Fjellstedt y Robinson (1975) y Hutzler y Dancis (1975). Se monitorizó la disminución de absorbancia a 340 nm (NADPH) en lectura cinética a 37°C en las distintas mezclas de reacción empleando un multilector Tecan PRO INFINITE M1000. En este sentido, se llevaron a cabo distintas optimizaciones para establecer las condiciones idóneas de la reacción enzimática.

6.6.1. Optimización del buffer de reacción y de la cantidad de enzima hAASS-myc-His6

Se ensayaron dos tampones de reacción: HEPES 50 mM (pH 7.35) y KH₂PO₄ 25 mM (pH 7.5). El primero está descrito en la bibliografía (17,18) y se añadió con 4 mM α -cetoglutarato, 0.4 mM NADPH, 10 mM L-lisina y distintas cantidades de enzima (1.5, 2.5, 5 y 10 μ g/pocillo); incubándose durante 15 minutos a 37°C. El buffer de KH₂PO₄ 25 mM (pH 7.5) suplementado con 5 mM α -cetoglutarato, 0.25 mM NADPH y 10 mM L-lisina, fue propuesto por el laboratorio colaborador (Duve Institute, Bruselas) y se combinó con cantidades similares de hAASS-myc-His6; durante 30 minutos a 37°C.

Los resultados obtenidos (Figuras 14 y 15) muestran que la hAASS-myc-His6 purificada fue activa, que la reacción transcurrió con mayor velocidad en HEPES 50 mM y que la disminución de la absorbancia es dependiente y proporcional a la cantidad de enzima purificada empleada. En base a esto, se seleccionó el HEPES 50 mM (pH 7.35) como buffer de reacción y las cantidades de 5 y 10 μ g de enzima para continuar con las siguientes optimizaciones.

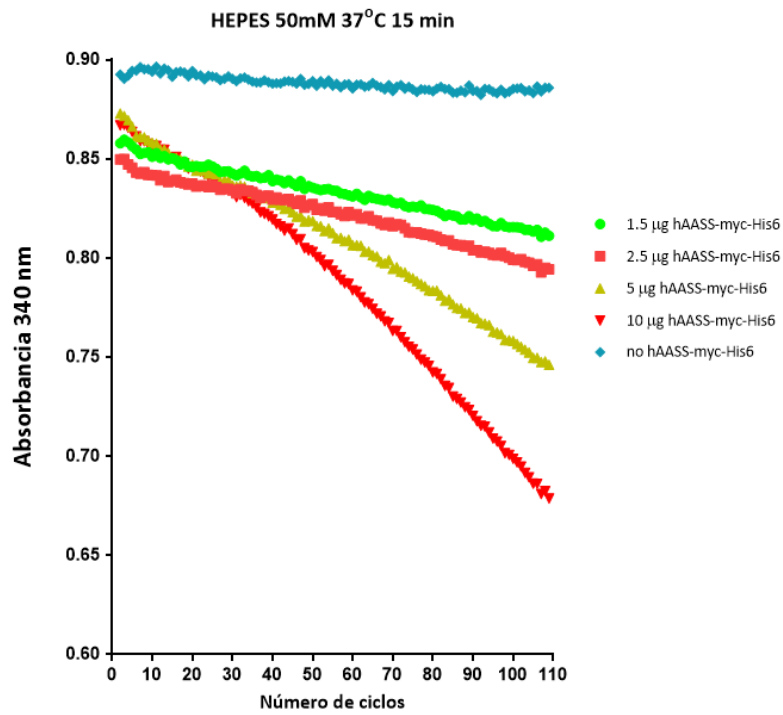


Figura 14 Resultados de la lectura de absorbancia del ensayo enzimático en buffer HEPES 50 mM empleando distintas cantidades de hAASS-myc-His6 por pocillo.

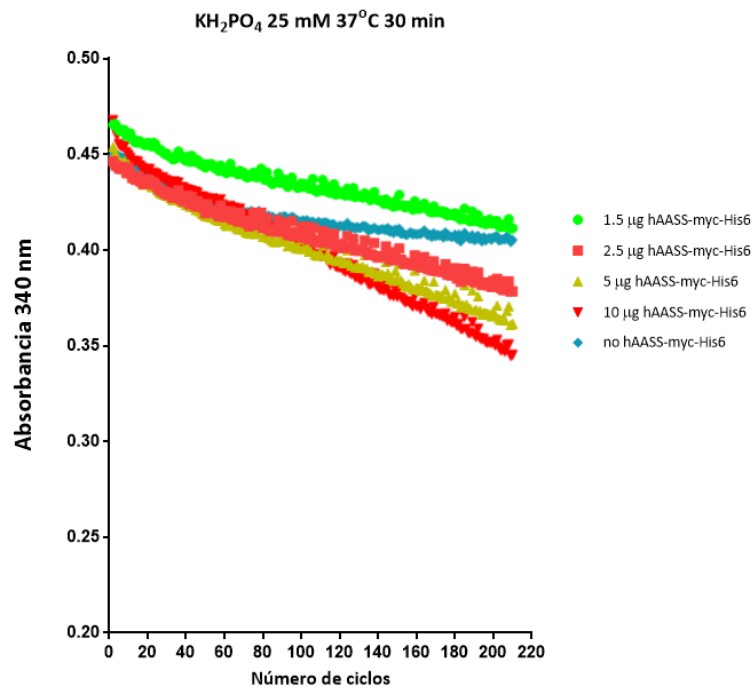


Figura 15 Resultados de la lectura de absorbancia obtenidos en el ensayo enzimático en buffer KH₂PO₄ 25 mM empleando distintas cantidades de hAASS-myc-His6 por pocillo.

6.6.2. Optimización del tiempo de incubación, determinación del efecto de la BSA en la mezcla de reacción y análisis de la estabilidad enzimática a ciclos de congelación-descongelación

Se llevó a cabo un ensayo en buffer HEPES 50 mM (pH 7.35), 4 mM α -cetoglutarato, 0.4 mM NADPH, con 5 y 10 μ g de hAASS-myc-His6 por pocillo (alícuotas descongeladas una o dos veces) y 10 mM L-lisina, alargando el tiempo de reacción durante 1 h a 37°C. En paralelo, se realizó un ensayo en buffer HEPES 50 mM (pH 7.35), 5 mM α -cetoglutarato, 0.25 mM NADPH, 0.5 mg/mL de albúmina de suero bovino (BSA) -condiciones propuestas por los colaboradores-, 5 o 10 μ g de enzima por pocillo (alícuotas descongeladas una o dos veces) y 10 mM L-lisina también durante 1 h a 37°C.

Los resultados (Figuras 16 y 17) muestran que con estos tiempos de incubación no existe una diferencia significativa entre los pocillos que contienen 5 y 10 μ g de enzima, ni en la actividad de la enzima descongelada por dos veces respecto a la que se descongeló una sola vez. Además, la presencia de BSA afecta negativamente a la actividad de la proteína hAASS-myc-His6. En consecuencia, se confirmó la estabilidad de la enzima a ciclos de congelación-descongelación y se estableció 1 h como tiempo de reacción. En este sentido, se seleccionó 5 μ g de hAASS-myc-His6 como cantidad enzimática óptima y se descartó la adición de BSA para futuros ensayos de optimización.

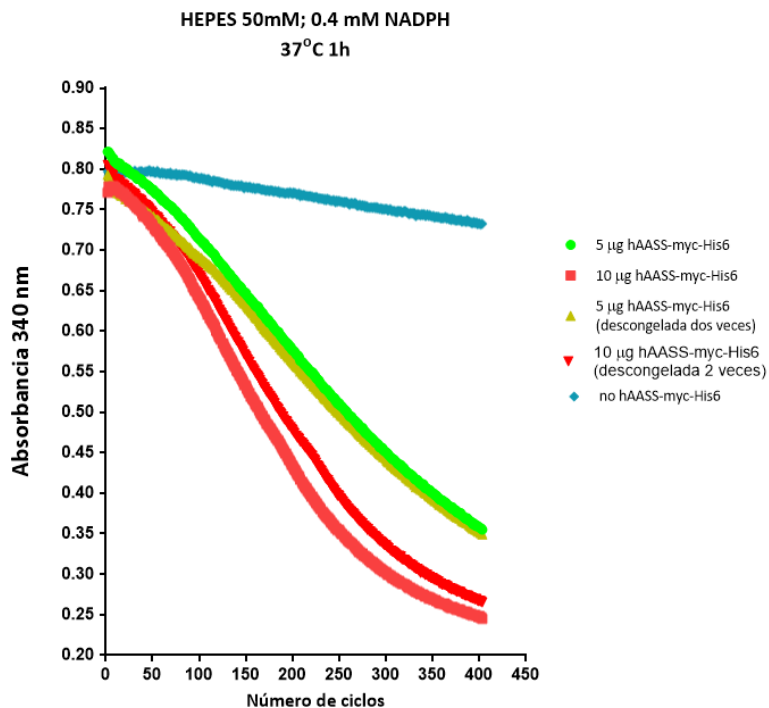


Figura 16 Resultados de la lectura de absorbancia en buffer HEPES 50 mM con 5 y 10 μ g de hAASS-myc-His6 por pocillo sometida a 1 o 2 ciclos de congelación.

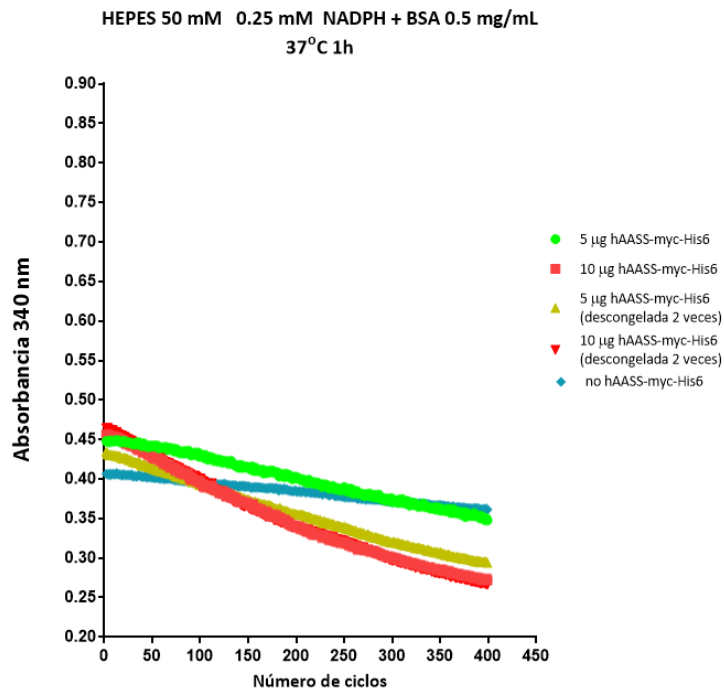


Figura 17 Resultados de la lectura de absorbancia en el ensayo de actividad en buffer HEPES 50 mM con 5 y 10 µg de hAASS-myc-His6 sometida a 1 o 2 ciclos de congelación-descongelación, añadiendo BSA (0.5 mg/mL) a la mezcla de reacción.

6.6.3. Optimización de la concentración de NADPH

Con el objetivo de optimizar la concentración de NADPH en la reacción enzimática se emplearon condiciones de sustratos y enzima seleccionadas anteriormente y se ensayó NADPH a distintas concentraciones (8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 y 0.0625 mM).

Los resultados obtenidos (Figura 18) indicaron que las concentraciones elevadas de NADPH saturan la señal de absorbancia sin observarse disminución con el tiempo, mientras que a concentraciones bajas de NADPH el enzima presenta una actividad muy reducida. La concentración de 0.5 mM de NADPH mostró una mayor ventana de actividad (variación de absorbancia), por lo que se seleccionó como concentración idónea para la reacción.

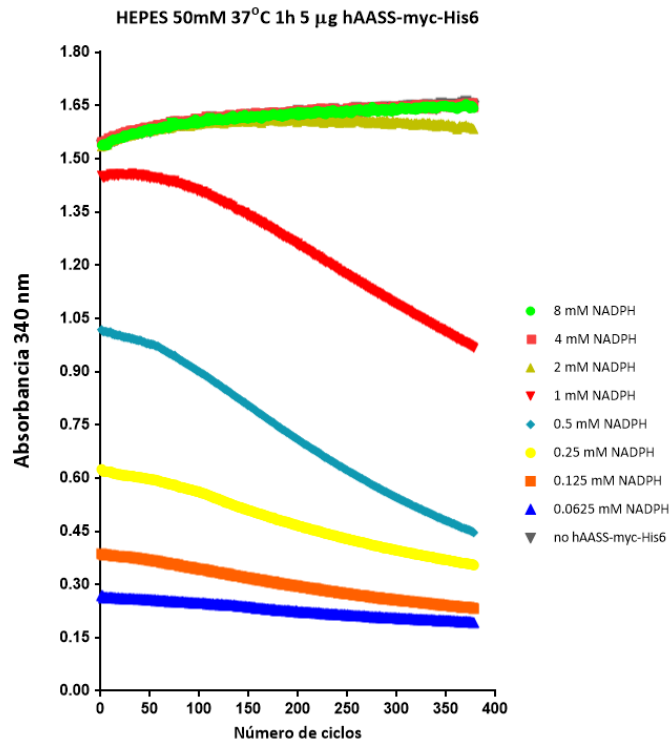


Figura 18 Resultados de la lectura de absorbancia (340 nm) en el ensayo de actividad en HEPES 50 mM empleando 5 μ g de hAASS-myc-His6 por pocillo y distintas concentraciones de NADPH durante 1 h a 37°C.

6.6.4. Optimización de la concentración de L-lisina

Para la optimización de la concentración de L-lisina en la mezcla enzimática se emplearon las condiciones definidas previamente y se testaron distintas concentraciones finales de L-lisina (80, 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25 y 0.625 mM).

Los resultados obtenidos (Figura 19) mostraron que a las concentraciones más elevadas de L-lisina, la enzima apenas presenta actividad o se encuentra inhibida, mientras que a las concentraciones más bajas no se apreció una ventana de actividad significativa. Debido a ello, se confirmó 10 mM como la concentración de L-lisina más favorable para la actividad reductasa de la hAASS-myc-His6 purificada.

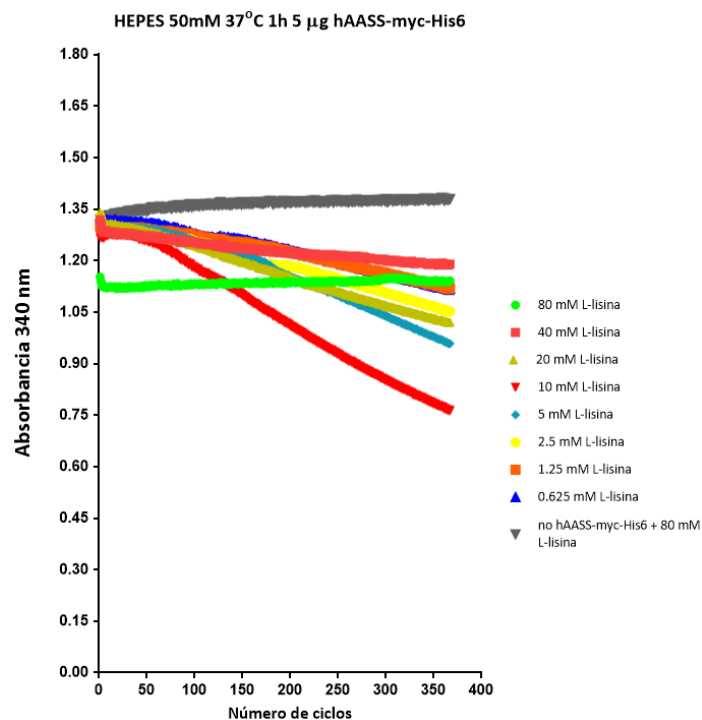


Figura 19 Resultados de la lectura de absorbancia (340 nm) en el ensayo de actividad enzimática en HEPES 50 mM empleando 5 µg de hAASS-myc-His6 por pocillo y distintas concentraciones de L-lisina durante 1 h a 37°C.

Tabla 1 Tabla resumen de las condiciones de reacción fijadas en el ensayo de actividad mediante la lectura cinética de absorbancia.

Buffer	HEPES 50 mM
Concentración final de NADPH	0.5 mM
Cantidad hAASS-myc-His6 por pocillo	5 µg
Concentración final L-lisina	10 mM
Temperatura	37°C
Tiempo de incubación	1 h

6.7. Acople de un ensayo luminiscente al ensayo de actividad reductasa de la hAASS-myc-His6

Una vez establecidas las condiciones de reacción en el ensayo de absorbancia, se procedió a acoplar un ensayo de luminiscencia para evitar interferencias de compuestos coloreados y aumentar la sensibilidad en el *screening* de moléculas. Para ello, se empleó el kit NAD(P)H-Glo™ Detection System

(G9062, *Promega*): en presencia del NADPH de la mezcla, la pro-luciferina es reducida a luciferina, que a su vez es transformada por la Ultra-Glo™ rLuciferasa para la producción de luminiscencia. La intensidad luminosa generada es proporcional a la cantidad de NADPH presente en la mezcla enzimática (Figura 20) (19).

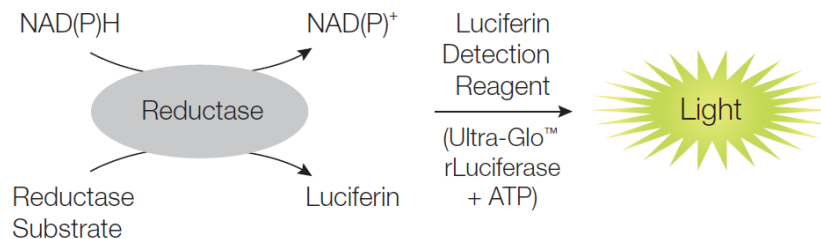


Figura 20 Esquema de la reacción luminiscente catalizada por el kit NAD(P)H-Glo™ Detection System (19).

En este sentido, se realizó un ensayo de actividad con lectura de absorbancia en las condiciones previamente establecidas (HEPES 50 mM pH 7.35, 4 mM α -cetoglutarato, 0.5 mM NADPH, 5 μ g hAASS-myc-His6 y 10 mM L-lisina); durante 1 h a 37°C.

Tras validar la actividad enzimática de la proteína recombinante purificada hAASS-myc-His6 (Figura 21), se acopló el ensayo de luminiscencia con lectura cinética a temperatura ambiente durante 1 h en el multilector HAMAMATSU (equipo disponible en el laboratorio que permite medir la luminiscencia de manera simultánea en todos los pocillos de la placa evitando variaciones de señal debidas a la lectura secuencial a tiempos distintos). Como muestran los resultados de la figura 22, en el ensayo no se obtuvo una ventana de señal significativa -Signal/Background (S/B) = 1.27- debido a la saturación enzimática provocada por las altas concentraciones de NADPH remanentes en las condiciones testadas en presencia de hAASS-myc-His6.

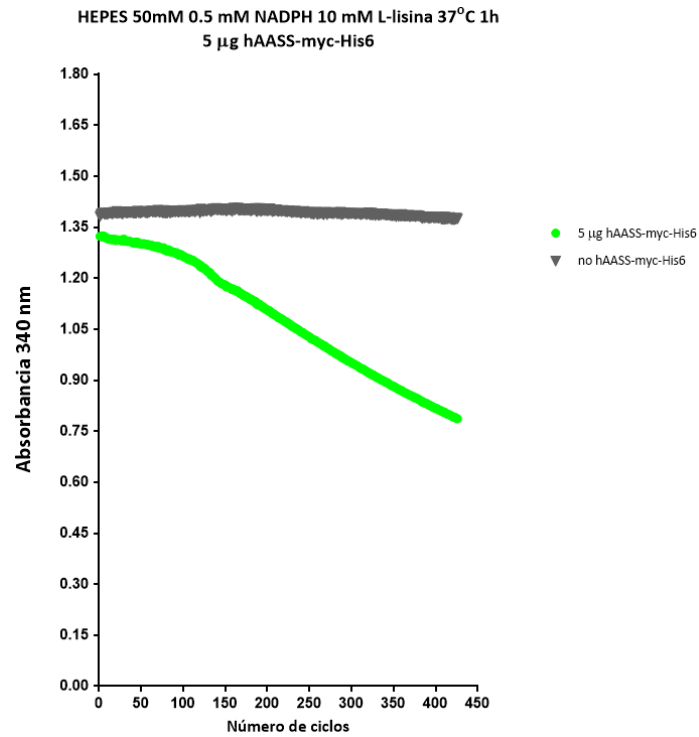


Figura 21 Resultados de la lectura de absorbancia en el ensayo de actividad reductasa en HEPES 50 mM, 0.5 mM NADPH, 5 µg hAASS-myc-His6/pocillo y 10 mM de L-lisina a 37°C durante 1 h.

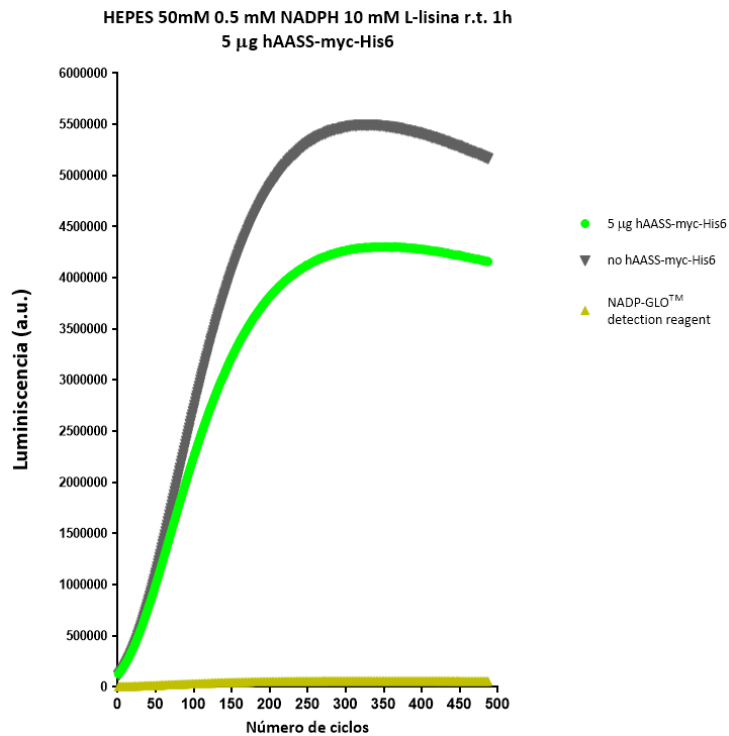


Figura 22 Resultados de la lectura cinética de luminiscencia empleando el NAD(P)H-Glo™ Detection System.

Con la finalidad de aumentar la ventana de actividad de la hAASS-myc-His6 se disminuyó la concentración inicial de NADPH a 0.4 mM (concentración descrita bibliográficamente (17,18) y la concentración mínima a la que la proteína recombinante purificada demostró ser activa en nuestro laboratorio) para evitar la saturación de la señal luminiscente y se aumentó el tiempo de incubación a 2 h para disminuir el NADPH remanente en la mezcla enzimática (Figura 23). En estas condiciones se monitorizó la cinética de la señal de luminiscencia durante 1 h (Figura 24): la saturación no se alcanzó hasta superados los 10 minutos, durante ese tiempo se observó una ventana de señal considerable, así como una buena proporcionalidad y reproducibilidad entre los distintos replicados y condiciones ensayadas. Además, se determinó el cociente S/B a 5 (8.22) y a 10 minutos (3.11), empleándose como tiempos de referencia en la reacción.

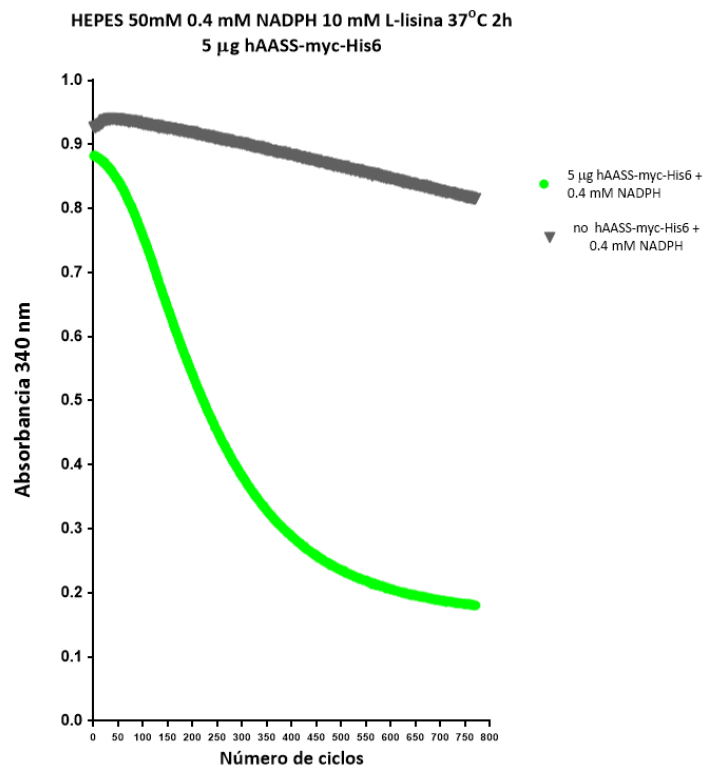


Figura 23 Resultados de la lectura de absorbancia en el ensayo de actividad reductasa en HEPES 50 mM, 0.4 mM NADPH, 5 µg de hAASS-myc-His6/pocillo y 10 mM de L-lisina a 37°C durante 2 h.

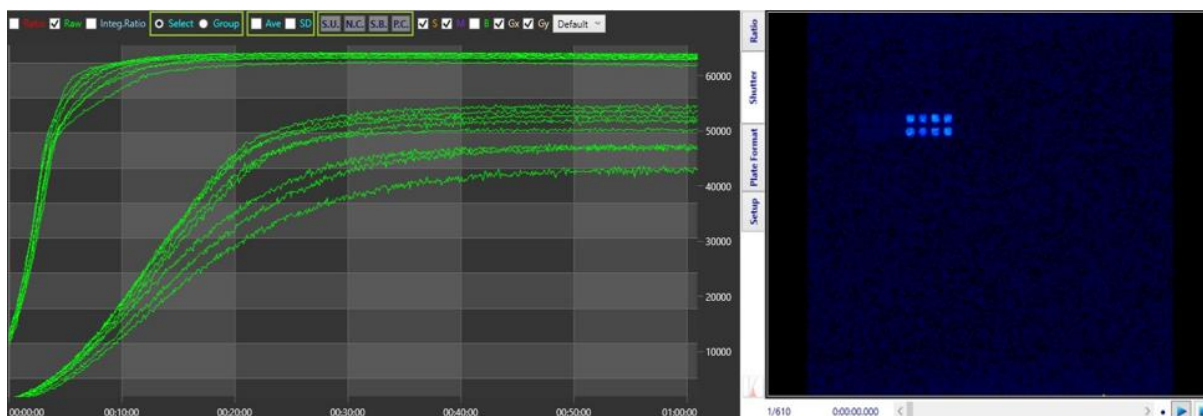


Figura 24 Resultados de la lectura en cinética de la señal de luminiscencia empleando el kit NAD(P)H-Glo™ Detection System (izquierda) e imagen de la placa multipocillo adquirida a los 10 minutos de incubación, que muestra la diferencia de señal en presencia y ausencia (azul) de hAASS-myc-His6 purificada y dializada (derecha).

6.8. Cálculo del parámetro estadístico de calidad Z' del ensayo de actividad de hAASS-myc-His6 (luminiscencia)

El parámetro estadístico Z' atiende a la variabilidad y dispersión de la señal en los replicados con valores máximos (ausencia de enzima) y en los replicados de valores mínimos (presencia de enzima y cantidades mínimas remanentes de NADPH), así como a la diferencia que existe entre dichos grupos de valores (rango de señal). Si Z' se sitúa entre 0.5-1 indica una buena ventana experimental y una baja dispersión, resultando en un ensayo de *screening* reproducible y robusto (20).

En este sentido, para el cálculo del parámetro Z' se tomaron los valores de señal luminiscente a los 5 y 10 minutos de lectura cinética obteniéndose un valor de 0.776 y 0.664 respectivamente, lo que indica que el ensayo desarrollado en nuestro laboratorio presenta a ambos tiempos una reducida variabilidad y una robustez y calidad adecuadas para su empleo en un *screening* de alto rendimiento para la búsqueda de compuestos inhibidores de la hAASS-myc-His6 (Figuras 25 y 26). Finalmente, el tiempo de lectura de luminiscencia seleccionado para la realización del posterior cribado de moléculas fue de 5 minutos, atendiendo a su mayor Z' y a su mayor ratio S/B -8.22 frente a 3.11 a los 10 minutos de lectura-.

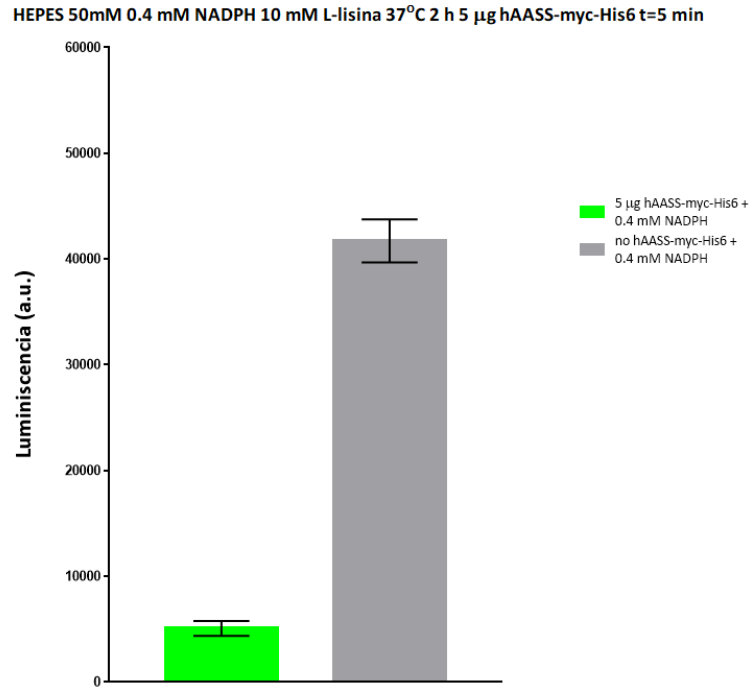


Figura 25 Valores medios de luminiscencia (+/- desviación estándar o SD) a los 5 minutos de lectura cinética en los replicados con 5 µg de hAASS-myc-His6 (verde) y sin hAASS-myc-His6 (gris) empleados para el cálculo del parámetro Z'.

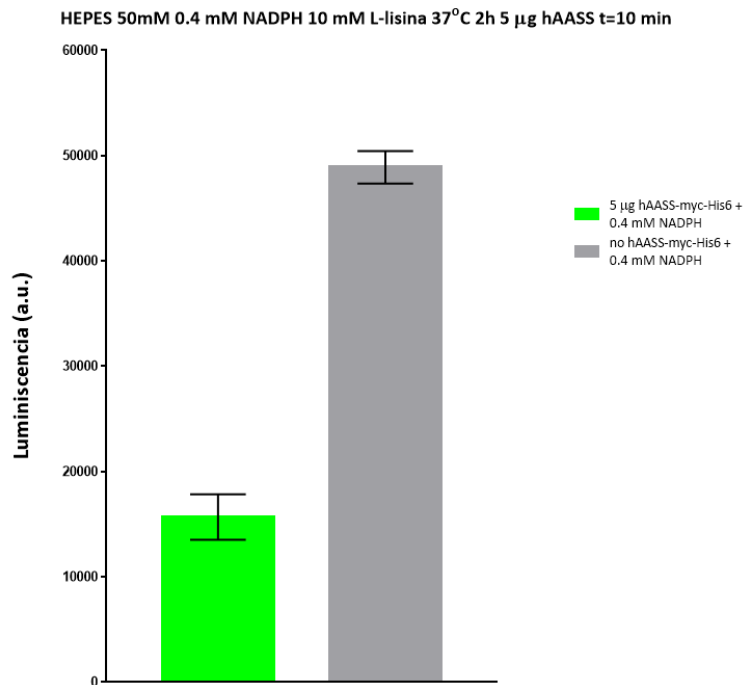


Figura 26 Valores medios de luminiscencia (+/- SD) a los 10 minutos de lectura cinética en los replicados con 5 µg de hAASS-myc-His6 (verde) y sin hAASS-myc-His6 (gris) empleados para el cálculo del parámetro Z'.

Tabla 2 Tabla resumen de las condiciones de reacción óptimas para la hAASS-myc-His6 fijadas tras las optimizaciones realizadas mediante el ensayo de luminiscencia.

Buffer	HEPES 50 mM
Concentración final NADPH	0.4 mM
Cantidad hAASS-myc-His6 por pocillo	5 µg
Concentración final de L-lisina	10 mM
Temperatura	37°C
Tiempo de incubación	2 h

7. DISCUSIÓN

Los principales logros de este trabajo han sido la producción y purificación de la proteína recombinante hAASS-myc-His6 activa y el desarrollo de un ensayo de *screening* miniaturizado y de alto rendimiento de actividad reductasa para la identificación de compuestos inhibidores potencialmente útiles en el tratamiento de la epilepsia dependiente de piridoxina (6).

Este estudio comenzó con la transformación del vector de expresión pEF6/Myc-His A, previamente clonado y cedido por el Duvet Institute de Bruselas, en células bacterianas competentes *E. coli* DH5α. La transformación, amplificación y posterior purificación del vector permitieron obtener la cantidad necesaria y suficiente de DNA plasmídico para llevar a cabo transfecciones transitorias sistemáticas.

Una vez purificado el plásmido se transfectaron células eucariotas HEK293T para la expresión de la proteína hAASS-myc-His6. En paralelo, se transfectó dicha línea celular en condiciones similares -ratio 1 (µg de DNA plasmídico): 2 (µL de reactivo de transfección)- empleando el plásmido pEF6/GFP-myc-His6 como control; a las 48 h de incubación la expresión de la proteína de fluorescencia verde (GFP) indicó que las condiciones de transfección utilizadas resultaron óptimas para una adecuada expresión proteica.

La lisis celular se realizó por choque térmico y la purificación de la hAASS-myc-His6 fue llevada a cabo mediante cromatografía de afinidad, empleando columnas de Ni²⁺ a las que se unió el tag de hexahistidinas de la proteína recombinante. La purificación se monitorizó mediante un detector UV (λ= 280 nm) presente en el cromatógrafo, observándose un pico de absorbancia (fracciones 5, 6 y 7) compatible con el desplazamiento de la hAASS-myc-His6 de la columna provocado por el imidazol

presente en el buffer de elución. Además, con las alícuotas eluidas de la muestra se procedió a la realización de una electroforesis SDS-PAGE y tinción en gel que mostró una banda a 112 kDa -peso molecular teórico de la hAASS-myc-His6 (17,18)- confirmando la presencia de la proteína recombinante en las tres fracciones eluidas. Las bandas observadas a menor peso molecular (40, 55 y 60 kDa) podrían deberse a una fragmentación de la proteína recombinante durante el proceso de lisis y purificación o bien a una copurificación de proteínas ricas en histidina con afinidad a la columna de Ni²⁺.

Para el desarrollo y validación del ensayo de actividad reductasa LKR se testaron las condiciones descritas en la bibliografía (17,18) y las propuestas por el laboratorio colaborador (Duve Institute, Bruselas) empleando distintas cantidades de hAASS-myc-His6. En este sentido, se observó una dependencia proporcional entre la disminución de la señal de absorbancia a 340 nm (NADPH) y la cantidad de enzima empleada, así como una mayor actividad enzimática en HEPES 50 mM -que se seleccionó como buffer de reacción-. Además, se estableció 1 h como tiempo óptimo de incubación, se comprobó la estabilidad de la proteína recombinante a ciclos de congelación-descongelación y se confirmó la disminución de actividad en presencia de BSA. Durante la optimización de la concentración de NADPH y L-lisina se comprobó que altas concentraciones de estos metabolitos producían una saturación de la señal de absorbancia, relacionada también con la inhibición sujeta a sustrato que la LKR ha mostrado en otras especies (21).

Una vez validada la actividad reductasa de la hAASS-myc-His6 mediante absorbancia, se procedió a implementar un ensayo de luminiscencia que evitará interferencias de compuestos coloreados en el *screening* posterior a realizar y que posee además una mayor sensibilidad. Se establecieron como condiciones óptimas de la reacción inicial hAASS-myc-His6 las siguientes: buffer HEPES 50 mM, 4 mM α -cetoglutarato, 0.4 mM NADPH, 5 μ g hAASS-myc-His6 por pocillo y 10 mM L-lisina; e incubación a 37°C durante 2 h. Finalmente, se calculó el parámetro estadístico de calidad Z' obteniéndose un valor de 0.776 a los 5 minutos de lectura de la luminiscencia, resultado que indicó que el ensayo es lo suficientemente robusto y reproducible para su aplicación en un *screening* de compuestos inhibidores LKR de alto rendimiento.

8. CONCLUSIONES

- Se ha conseguido expresar y purificar la proteína recombinante hAASS-mys-His6, que constituye la principal diana terapéutica para el tratamiento de la epilepsia dependiente de piridoxina, en su forma activa.
- Se confirmó la actividad reductasa de la hAASS-myc-His6 mediante el desarrollo de un ensayo de absorbancia ($\lambda = 340$ nm) observándose una proporcionalidad directa entre la disminución de la señal específica (consumo de NADPH) y la cantidad de enzima empleada. Además, se acopló con éxito un ensayo de luminiscencia para reducir interferencias de compuestos coloreados y aumentar la sensibilidad en posteriores ensayos de *screening* de alto rendimiento.
- Se constató la reproducibilidad y robustez del método experimental para la búsqueda de compuestos inhibidores LKR mediante el cálculo del parámetro estadístico de calidad Z' ($Z' = 0.776$).

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Orpha.net: Portal de información de enfermedades raras y medicamentos huérfanos [Internet]. París: Orphanet; 2000 [actualizado nov 2015; citado 23 May 2022]. Epilepsia dependiente de piridoxina. Disponible en: https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=ES&Expert=3006
2. PDE: Pyridoxine-Dependent Epilepsy [Internet]. [citado 23 May 2022]. Disponible en: <https://www.pdeonline.org/>
3. Kaminiów K, Pająk M, Pająk R, Paprocka J. Pyridoxine-Dependent Epilepsy and Antiquitin Deficiency Resulting in Neonatal-Onset Refractory Seizures. *Brain Sci.* 2021 Dic;12(1):65.
4. Wempe MF, Kumar A, Kumar V, Choi YJ, Swanson MA, Friederich MW, et al. Identification of a novel biomarker for pyridoxine-dependent epilepsy: Implications for newborn screening. *J Inherit Metab Dis.* 2019 May;42(3):565-74.
5. Leandro J, Houston SM. The lysine degradation pathway: Subcellular compartmentalization and enzyme deficiencies. *Mol Genet Metab.* 2020 Sep;131(1):14-22.
6. Crowther LM, Mathis D, Poms M, Plecko B. New insights into human lysine degradation pathways with relevance to pyridoxine-dependent epilepsy due to antiquitin deficiency. *J Inherit Metab Dis.* 2019 Jul;42(4):620-8.
7. Parra M, Stahl S, Hellmann H. Vitamin B₆ and Its Role in Cell Metabolism and Physiology. *Cells.* 2018 Jul;7(7):84.
8. Minenkova A, Jansen EEW, Cameron J, Barto R, Hurd T, MacNeil L, et al. Is impaired energy production a novel insight into the pathogenesis of pyridoxine-dependent epilepsy due to biallelic variants in ALDH7A1? *PLOS ONE.* 2021 Sep;16(9):e0257073.
9. Xue J, Wang J, Gong P, Wu M, Yang W, Jiang S, et al. Simultaneous quantification of alpha-aminoadipic semialdehyde, piperideine-6-carboxylate, pipercolic acid and alpha-aminoadipic acid in pyridoxine-dependent epilepsy. *Sci Rep.* 2019 Ag;9:11371.
10. Coughlin CR, van Karnebeek CDM, Al-Hertani W, Shuen AY, Jaggumantri S, Jack RM, et al. Triple therapy with pyridoxine, arginine supplementation and dietary lysine restriction in pyridoxine-dependent epilepsy: Neurodevelopmental outcome. *Mol Genet Metab.* 2015 Sep;116(1-2):35-43.
11. Kopec J, Pena I, Rembeza E, McLaughlin M, Fedorov O, Strain-Damerell C, et al. Human alpha-aminoadipic semialdehyde synthase (AASS); A Target Enabling Package. 2017.
12. Zhou J, Wang X, Wang M, Chang Y, Zhang F, Ban Z, et al. The lysine catabolite saccharopine impairs development by disrupting mitochondrial homeostasis. *J Cell Biol.* 2018 Dic;218(2):580-97.

13. Invitrogen. pEF6/Myc-His A, B and C. [Internet]. 2011. [citado 30 May 2022]. Disponible en: https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/pef6mychis_man.pdf
14. Macherey-Nagel. User manual Endotoxin-free plasmid DNA purification. [Internet]. 2022. [citado 30 May 2022]. Disponible en: <https://www.mn-net.com/media/pdf/18/eb/8f/Instruction-NucleoBond-Xtra-EF.pdf>
15. Tan E, Chin CSH, Lim ZFS, Ng SK. HEK293 Cell Line as a Platform to Produce Recombinant Proteins and Viral Vectors. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021 Dic;9:796991.
16. Polyplus. jetPEI® *in vitro* DNA transfection reagent protocol. [Internet]. 2020. [citado 30 May 2022]. Disponible en: <https://www.polyplus-transfection.com/products/jetpei/>
17. Fjellstedt TA, Robinson JC. Purification and properties of L-lysine- α -ketoglutarate reductase from human placenta. *Arch Biochem Biophys*. 1975 Jun;168(2):536-48.
18. Hutzler J, Dancis J. Lysine-ketoglutarate reductase in human tissues. *Biochim Biophys Acta*. 1975 En;377(1):42-51.
19. Promega. Technical Manual NAD(P)H-Glo™ Detection System. [Internet]. 2017. [citado 30 May 2022]. Disponible en: https://www.promega.es/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/nadph-glo-detection-system-protocol.pdf?rev=b24bf73d0bbd4ee0b3ee3aedbf8152e4&sc_lang=en
20. Zhang JH, Chung TDY, Oldenburg KR. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen*. 1999 Abr;4(2):67-73.
21. Pink DBS, Gatrell SK, Elango R, Turchinsky J, Kiess AS, Blemings KP, et al. Lysine α -ketoglutarate reductase, but not saccharopine dehydrogenase, is subject to substrate inhibition in pig liver. *Nutr Res*. 2011 Jul;31(7):544-54.

10. AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a José Manuel Brea Floriani y a David Moreira Álvarez toda la ayuda que me han ofrecido, así como sus consejos para lograr el mejor resultado posible. Muchas gracias a David por haberme acompañado y guiado durante el desarrollo experimental del trabajo resolviendo todas las dudas que me surgían.

Al Duve Institute de Bruselas por habernos cedido los vectores de expresión pEF6/hAASS-myc-His6 y pEF6/GFP-myc-His6.

A mis padres por todo el apoyo y confianza que me han transmitido en todo momento, impidiendo que olvidara que con trabajo, esfuerzo y dedicación podría conseguir mi meta.

A mi hermana Paula, mi mejor maestra en el día a día, capaz de sacarme una sonrisa siempre, incluso después de mis largas jornadas de estudio.