

Ángela Jiménez-Ortas<sup>1</sup>, Luis Martínez-Heredia<sup>2,3</sup>, Francisco Andújar-Vera<sup>3,4,5</sup>, Raquel Sanabria-de la Torre<sup>2,3</sup>, Sheila González-Salvatierra<sup>2,3,6</sup>, María Carmen Andreo-López<sup>6</sup>, Nuria Cabrera-Gómez<sup>2</sup>, Manuel Muñoz-Torres<sup>2,3,6,7</sup>, Cristina García-Fontana<sup>3,6,7</sup>, Beatriz García-Fontana<sup>3,6,7</sup>.

1. Dpto. Bioquímica y Biología Molecular II, Universidad de Granada. 2. Dpto. de Medicina, Universidad de Granada. 3. Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada (ibs.GRANADA), 4. Dpto. de Informática e Inteligencia Artificial, Universidad de Granada. 5. Instituto Andaluz de Investigación en Ciencia de Datos e Inteligencia Computacional (Instituto DaSCI), Granada. 6. Unidad de Endocrinología y Nutrición. Hospital Universitario Clínico San Cecilio. Granada. 7. CIBERFES. Instituto de Salud Carlos III. Madrid, España.

## 1. INTRODUCCIÓN

La hipofosfatasa (HPP) es una enfermedad genética rara caracterizada por una disminución de la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNSALP) a causa de mutaciones en el gen *ALPL* que codifica esta proteína. TNSALP es una enzima muy importante en la mineralización ósea encargada de generar fosfato inorgánico (Pi) a partir de pirofosfato (PPi). Otro sustrato de la misma es el piridoxal-5'-fosfato (PLP). Aunque las principales manifestaciones clínicas de HPP ocurren a nivel óseo, existe una gran heterogeneidad clínica que frecuentemente dificulta el diagnóstico debido al solapamiento de su sintomatología con la de otras patologías más prevalentes. En consecuencia, es necesario realizar estudios de caracterización funcional y estructural cuando se identifica una nueva mutación de significado incierto en el gen *ALPL* y estudiar su relación con las manifestaciones clínicas para establecer una relación geno-fenotípica. En el presente estudio se caracterizaron dos variantes (p.Leu6Ser y p.Thr167del) no descritas hasta el momento.

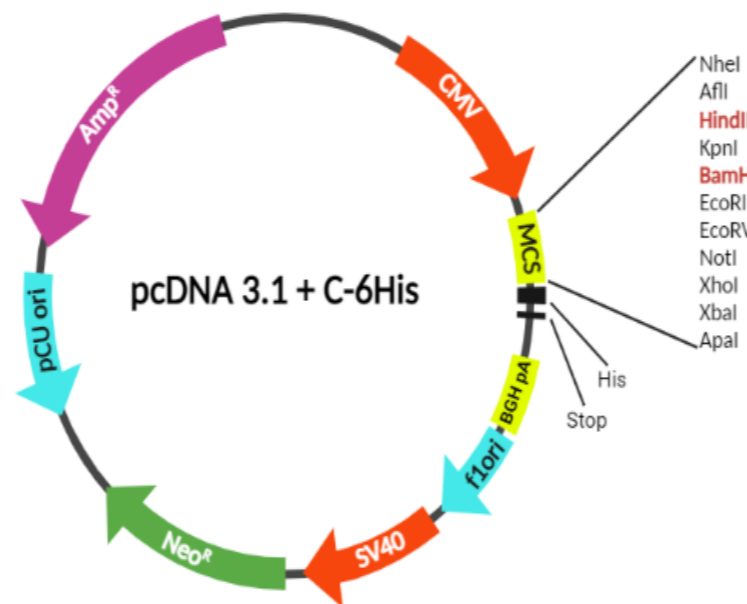
## 2. OBJETIVOS

- Identificación de nuevas mutaciones en el gen *ALPL* en pacientes diagnosticados con HPP.
- Sobreexpresión del gen *ALPL* con las diferentes mutaciones en células HEK293T.
- Caracterización funcional y estructural de las proteínas codificadas por las nuevas variantes del gen *ALPL*.
- Determinación de la correlación geno-fenotípica de las mutaciones.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

Determinación de ALP y PLP en suero en dos pacientes con clínica compatible con HPP y secuenciación del gen *ALPL* mediante Sanger

Diseño de construcciones plasmídicas: inserción en el plásmido pcDNA 3.1 de las secuencia del gen *ALPL* *wild type* (WT) y de las variantes mutadas. También se empleó pcDNA 3.1 vacío como control negativo. De esta forma se obtienen 4 plásmidos distintos.



Transfección de células HEK293T mediante el reactivo LipoD293 (SigmaGen Laboratories) con los diferentes vectores de expresión

Comprobación de la eficiencia de la transfección mediante RT-qPCR

Determinación de la actividad ALP en células HEK293T transfectadas mediante el Alkaline Phosphatase Assay Kit (Abnova)

Modelado 3D para estudiar el efecto de las mutaciones en la estructura tridimensional de TNSALP mediante AlphaFold. Además, se utilizó CASTp para estudiar el efecto de las mutaciones en los distintos bolsillos de TNSALP

Para el análisis estadístico de los resultados se empleó el IBM SPSS Statistics. Se realizó un ANOVA corregido por el test de Tukey para la comparación entre grupos.

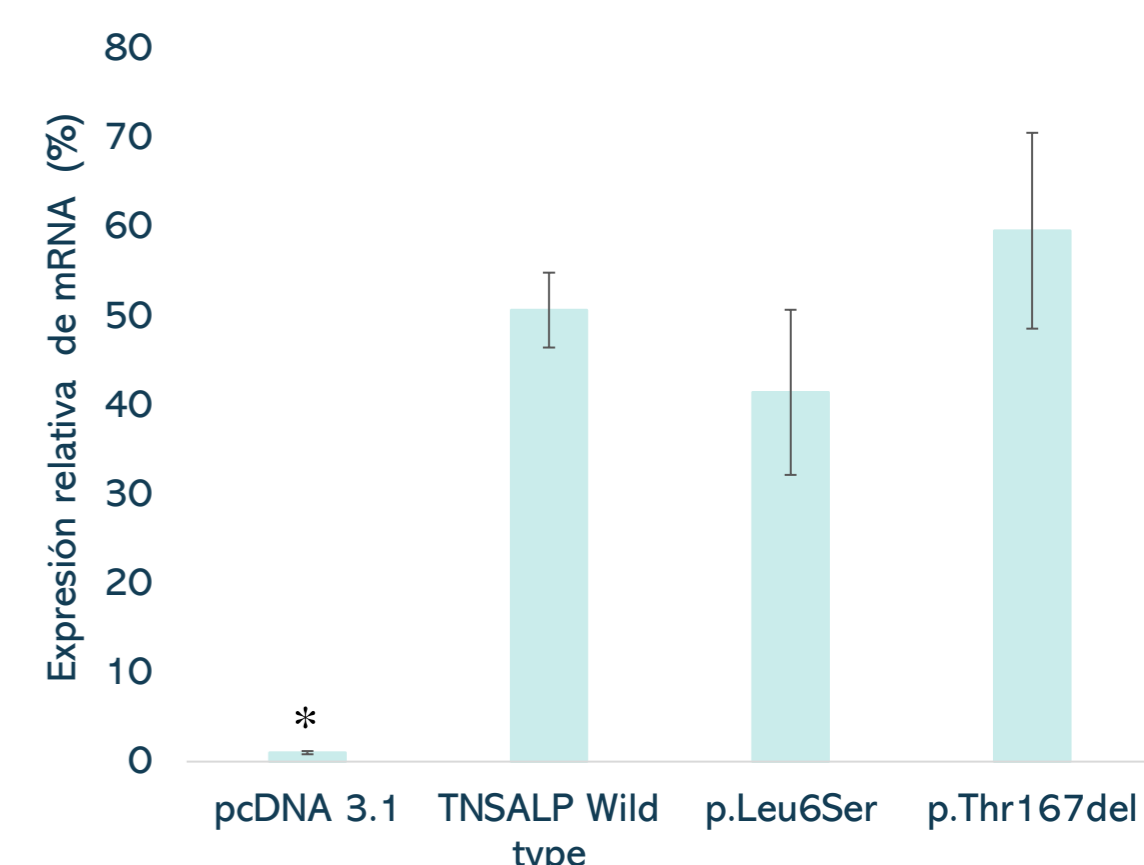
## 4. RESULTADOS

### 4.1 Niveles séricos de ALP y PLP / nuevas variantes:

|             | Paciente 1 (Varón, 15 años)<br>c.17T>C/ p.Leu6Ser | Paciente 2 (Varón, 15 años)<br>c.498_500del/ p.Thr167del | Valores de referencia |
|-------------|---|--|-----------------------|
| ALP (U/L)   | 73  | 45   | 75-312                |
| PLP (ng/mL) | 118   | 45'5   | 3'6-18                |

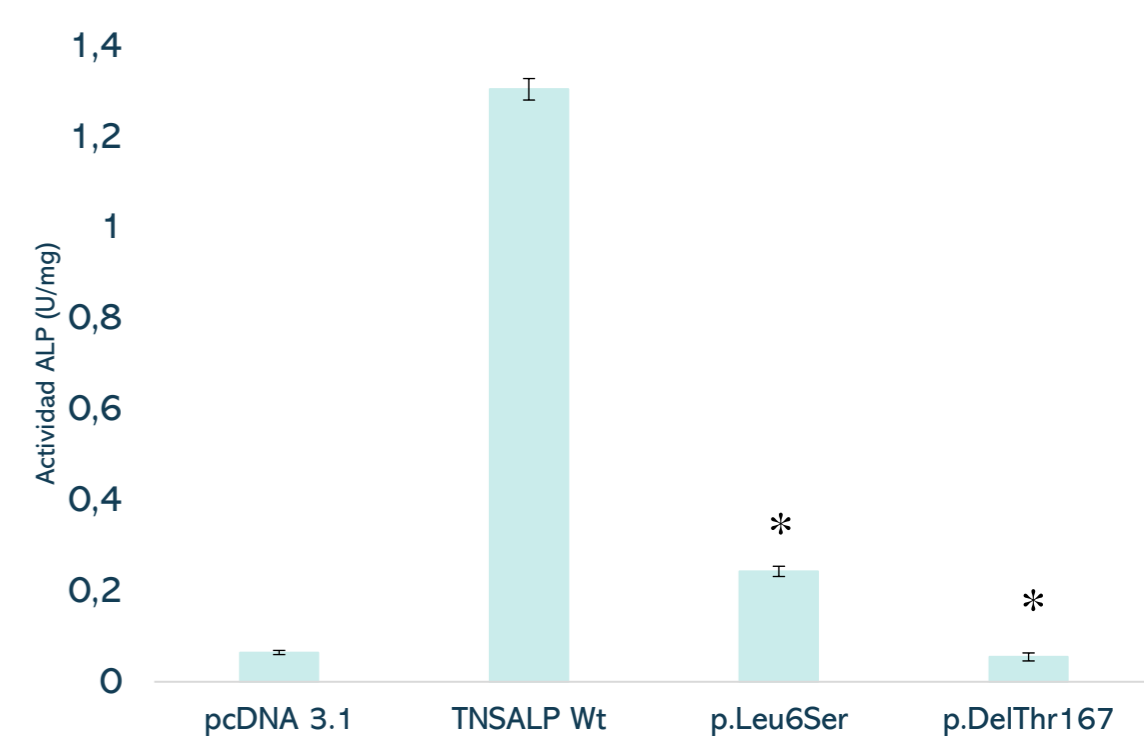
### 4.2 Expresión de mRNA de TNSALP en células HEK293T transfectadas:

Los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en la expresión entre las células transfectadas con pcDNA 3.1 conteniendo el gen *ALPL* WT o mutado, excepto con pcDNA 3.1 vacío (\*), lo que demuestra que la transfección ha ocurrido de forma similar en todos los casos.



### 4.3 Determinación de la actividad ALP:

El símbolo “\*” indica que existen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ) en la actividad entre p.Leu6Ser y p.Thr167del respecto a TNSALP WT.



### 4.4 Caracterización estructural de TNSALP:

En el caso p.Leu6Ser, las modificaciones a nivel estructural no fueron muy significativas. En cuanto a p.Thr167del, CASTp mostró una reducción del área del sitio activo.

## 5. CONCLUSIONES

La variante p.Thr167del presenta una disminución muy pronunciada de la actividad respecto a TNSALP WT, lo cual concuerda con los niveles séricos de ALP y PLP del paciente. Además, la caracterización estructural mostró una reducción del área del sitio activo. Todo ello, junto con las manifestaciones clínicas asociadas con HPP que muestra el paciente, sugiere que esta variante es probablemente patogénica. En cuanto a la variante p.Leu6Ser, la disminución de la actividad no es tan drástica y los efectos a nivel estructural no son muy llamativos. Por otra parte, el paciente no presenta una sintomatología muy grave, por lo que se deduce que se trata de una variante asociada a un fenotipo leve de HPP.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Villa-Suárez, J. M. et al. Hypophosphatasia: A Unique Disorder of Bone Mineralization. *Int J Mol Sci* 22, 4303 (2021).
2. García-Fontana, C. et al. Epidemiological, Clinical and Genetic Study of Hypophosphatasia in A Spanish Population: Identification of Two Novel Mutations in The Alpl Gene. *Sci Rep* 9, 9569 (2019).
3. Tian, W., Chen, C., Lei, X., Zhao, J. & Liang, J. CASTp 3.0: computed atlas of surface topography of proteins. *Nucleic Acids Research* 46, W363–W367 (2018).