



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Model animal de malalties associades a canals de clorur en peix zebra

Carla Pérez Rius



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 3.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

# Model animal de malalties associades a canals de clorur en peix zebra

Programa de Doctorat en Biomedicina

Doctoranda:

**Carla Pérez Rius**

Tesi realitzada sota la direcció de:

**Dr. Raúl Estévez Povedano**  
**Dr. Alejandro Barrallo Gimeno**

Departament de Ciències Fisiològiques  
Facultat de Medicina (Campus Bellvitge)  
Universitat de Barcelona



PROGRAMA DE DOCTORAT EN BIOMEDICINA  
UNIVERSITAT DE BARCELONA

Memòria presentada per optar al grau de doctor per la Universitat de  
Barcelona, 2017

**CARLA PÉREZ RIUS**

**La interessada,**

Carla Pérez Rius

**Els directors de la tesi,**

Raúl Estévez Povedano

Alejandro Barrallo Gimeno

Departament de Ciències Fisiològiques, UB



*Remember a day is just a page in the book, Some pages are written better than others.  
Be patient. Wait for the paragraph to end and turn the page. Write your life and  
pollinate it with grand experiences and courage and joy. Be the book, Write the book  
you want your life to be*

*- Otep Shamaya*



*Let us be grateful to the people who make us happy; they are the charming gardeners who make our souls blossom*

*- Marcel Proust*

No tothom té la oportunitat de viure l'experiència de realitzar una tesi doctoral, i em sento molt afortunada d'haver pogut viure aquesta aventura. Aquests quatre anys han estat plens de molts moments, d'alegries i de frustracions, de conèixer persones que d'alguna manera o altre et marcaran i d'acomiarar-nos d'aquestes que t'han marcat des de la infància i que mai tornaràs a veure.

Durant aquest període he après a créixer. No només a nivell professional, sinó que també com a persona. Per a mi, realitzar una tesi ha sigut més que treballar en un laboratori. Realitzar una tesi ha estat aprendre a anar de la mà tant de l'èxit com de la frustració. He après que no estàs sol, sempre hi ha algú disposat a donar un cop de mà. Que molts cops la solució està més enllà de les teves mans. A canviar. Evolucionar. Ha estat un dels períodes més durs en la meua vida i que sense cap dubte mai oblidaré. Igual que tampoc oblidaré les persones que he conegut durant aquest viatge i amb els que he compartit moments únics tant en la poiatada com fora del laboratori. Els que em coneixeu sabeu que no acostumo a compartir sentiments i que no em mola fer la pilota, així que les paraules que venen a continuació són sinceres.

Primer de tot, vull donar les gràcies al **Raúl** i a l'**Alejandro**, els capitans del vaixell. Sense la vostra confiança no hi hauria aventura per explicar. Gràcies per tot el coneixement que m'heu transmès. Espero haver-lo absorbit al màxim i aplicar-lo ben aviat. Envejo la teva bola de vidre Raúl, espero que algún dia comparteixis com t'ho fas! Alejandro, enhorabona per la plaça!

Nois del 4154/4116!!! Sincerament, no tinc cap queixa respecte vosaltres. He tingut molta sort de tenir-vos com a companys. Gràcies a tots per aguantar la meua música a tope jajajajaja. **Tania** i **Xavi**, no vaig poder compartir gaire temps amb vosaltres, però va ser un plaer conèixer-vos. **Sònia**, gràcies per dedicar-me el teu temps per ensenyar-me durant el teu últim any de tesi. Ara entenc que hauria de ser dur jejeje. Va ser un plaer tornar-te a tenir com a postdoc un any més (no oblidaré la tecnologia punta jajajaja). **Tanit**, l'alegria de la casa. Igual que la Sònia, gràcies per ajudar-me durant l'últim any. M'emporto una gran ensenyança per part teva: somriure cada dia



encara que la vida sembli el mateix infern. Mai oblidaré els teus “Bon dia!” amb un somriure cada matí inclòs quan passaves un moment molt dur, no t’imagines la força que em donaves. **Héctoooooooooor**, moltes gràcies per tornar-me a motivar amb el tema de la guitarra. Sempre he anat posant excuses jajaja. Quan li hagi tornat a agafar el fil anem al local i ho petem! Gràcies també pel teu bon humor, les bromes i aguantar les meves “menjades d’olla”. Admiro la teva capacitat de control i mostrar sempre tranquil·litat, espero haver-ne après una mica jejeje. **Xabi** amb “b”, quina casualitat conèixe’t al màster i després fer la tesi en el mateix laboratori. Admiro molt la teva capacitat de raonament i relacionar conceptes, crec que arribaràs lluny si ho vols. A primer cop de vista sembles molt reservat, però ets una bona peça també. Sempre recordaré el moment “pingu” jajajajajaja. **Marta** i **Efrén**, els nous reforços. No perdeu aquesta energia i bon rollo que teniu, us toca mantenir el lab “a flote”!. Senyores i senyors, amb tots vostès... **Anna VHIR**, la maga! Tot i que oficialment no ets del lab, no deixes de ser una més. He après molt de tú, tant d’anàlisi bioinformàtic com preparar grans viatges! Jejeje Espero que les excursions Bellvitge-VHIR arribin a bon port. Gràcies amics per la vostre llum. :)

Els estudiants de pràctiques, gràcies per ajudar-me traient-me una miqueta de feina de sobre, fer que millori a l’hora d’explicar i a descobrir que disfruto fent-ho. Especialment la **Sara** i l’**Alberto**. “Vaya dos patas para un banco” que van coincidir alhora. M’alegro moltíssim que hagueu passat pel laboratori i que d’aquí hagi florit una bona amistat. Las Rapers y el chorrillo, oh yeah!

Voldria agrair a tothom tant de la **quarta** com **cinquena** plantes de Bellvitge per tots els moments (amb especial carinyo pels **FisiològiX**). Llàstima que amb alguns només hem coincidit en les *mojitadas* i pica-pica, però tot això que m’emporto! Ja em perdonareu (o no jajajaja) que no posi noms, però veig que encara em deixaré algú, així que prefereixo fer un agraïment global.

El grup dels nucleòtids! Per mi va ser una alliberació anar a estudiar a Vic. **Antonio**, **Georgina** i **Anna**, hem viscut un munt de coses plegats. M’alegro que fins i tot després de moments d’alta tensió entre nosaltres continuem plegats. Antonio i Georgina, em sento afortunada d’haver coincidit amb vosaltres des d’aquells primers dies a la universitat i que gràcies als interminables viatges en tren (no sabria dir la de partides a cartes que haurem fet jajajaja) puc dir que vaig fer dos grans amics per la resta de la

meva vida. Anna, que bé que la Georgina et portés un dia! No saps la calma i confiança que transmetes. Gràcies per despertar-me el cuc de viatjar a altres països. Des de que vam acabar la carrera ens hem anat veient cada cop menys, el qual és normal perquè cadascú té la seva feina/vida i és complicat que coincidim. Però sé que sempre puc comptar amb vosaltres per qualsevol cosa. :)

Diuen que qui té un amic té un tresor. Doncs resulta que en vaig trobar un molt valuós durant el màster. Té el nom d'**Aida**. Mai he vist a algú tan "currante" com tu i això s'ha vist reflexat en la gran tesi que has defensat fa poc. Et vull donar les gràcies per tot el que has fet per mi. Gràcies per esperar-me fora de la cova quan ni jo mateixa m'adonava que hi estava atrapada. Gràcies per la teva companyia durant l'escriptura de la tesi, sense el teu recolzament m'hauria costat molt més, n'estic segura (vas fer que en alguns moments fos divertit i tot XD). Has estat una peça clau perquè hagi pogut evolucionar fins a la persona que sóc avui dia. Fins i tot sembla que descobreixes coses de mi mateixa abans que jo jajajaja I a veure quan em tornes a convidar a Girona! Nogensmenys vaig tocar el cul a la lleona i encara res de res... (aquí ho deixo xata) jajajaja Per afegitó, encara et tinc com a Aida Neuro. :)

També estic agraïda a un conjunt de persones que tot i que no conec personalment, han estat la matèria prima per forjar la persona que sóc avui dia. Primer de tot, al senyor **Jacques Costeau**, per contagiar-me l'interès per la vida marina des de ben petita i a partir d'aquí decidir seguir una carrera científica. D'altre banda, tots els que em coneixeu sabeu que la música és una part essencial de la meva vida. A vegades et trobes en situacions en les quals només trobes una via de sortida a través d'un poema, d'una melodia, d'una lletra. Per aquesta raó estaré eternament agraïda a una llarga llista de grups. Voldria destacar el grup **Otep**, i especialment a la vocalista del grup i poeta **Otep Shamaya**. Mai unes cançons m'havien "parlat" tant. Gràcies per encendre la meva ànima i per les onades d'inspiració. *Art Saves*.

**Sonia**, la meva musa. Voldria dedicar-te a tu també unes paraules. No sé si ens hem conegut en el millor moment, ja que has hagut d'aguantar aquests últims mesos de la tesi jajajaja. T'agraeixo que t'hagis quedat al meu costat i que m'hagis animat a tirar endavant quan ja no podia més. Des de la teva arribada sóc un llibre obert (una mica, eh? jeje), m'és més fàcil explorar i expressar els meus sentiments. Em fas sentir humana, viva. M'inspires. Havia oblidat el sentiment de voler lluitar per un somni, gràcies per ajudar-me a recuperar-lo. Em sento molt afortunada i feliç de poder

escriure aquest nou capítol de la meva vida amb tu. Et vull dedicar un dels meus poemes preferits.

*There is this  
weight  
within me*

*A kiss*

*Heavier than  
the sun*

*A slow  
invasion  
of strange  
beauty*

*Injected  
in the flesh*

*And odd  
nourishment  
for my soul*

*Thickening  
far away atoms  
like fat, happy  
Buddahs*

*An intimate  
new language*

*Softer than  
the breath  
that slips  
from  
your lips*

*In veritas*

*The depth  
of you  
fills me*

*And I burn  
And I burn*

*- Otep Shamaya*

Ha arribat el moment de dedicar unes paraules a les persones més importants en la meva vida. Als meus pares **Santi** i **Lourdes** i al meu germà **Enric**, gràcies per donar-me suport en tot moment per realitzar aquest camí. Als meus pares els voldria agrair l'esforç que han fet per oferir-me la millor educació possible (especialment la universitat) i per ajudar-me sempre que he tingut dubtes oferint-me els vostres punts

de vista deixant-me escollir sempre el meu camí, mai imposant-lo. Sempre dieu que us hauria agradat donar més, però la veritat és que tinc tot el que vull/necessito. Al meu germà, que sempre dius que la missió del germà gran és fer la vida impossible al petit i intentes fer-me la punyeta, saps que en el fons t'estimes la teva germana petita jajajaja. Gràcies per ajudar-me, especialment en els problemes de física :P. Em sento molt orgullosa i afortunada de tenir-vos. És normal que a vegades tinguem les nostres diferències i ens posem de morros, però que us quedi clarinet que per res del món desitjaria tenir una altre família.

Especialment per aquelles persones que ja no hi són. Aquesta tesi va per vosaltres. Avis, Santi, no us oblidó. Gràcies per tot el que m'heu donat.



# **ÍNDIX**

<b>ABREVIATURES</b>	1
<b>INTRODUCCIÓ</b>	7
<b>1. HOMEÒSTASI IÒNICA</b>	9
<b>1.1 Canals i transportadors</b>	9
<b>1.2 Família CIC</b>	11
<b>2. CLORUR EN LA FISIOLOGIA CEL·LULAR</b>	18
<b>2.1 Fisiologia muscular</b>	18
2.1.1 Estructura del múscul esquelètic	19
2.1.2 Propagació del potencial d'acció	20
2.1.3 Repolarització de les fibres musculars	21
2.1.4 CIC-1 i Miotonia congenita	21
2.1.4.1 Propietats biofísiques del canal CIC-1	21
2.1.4.2 Miotonia congènita	25
2.1.4.3 Farmacologia de CIC-1 i possibles teràpies	27
<b>2.2 Fisiologia de les cèl·lules glials</b>	29
2.2.1 Sifoneig de K <sup>+</sup>	29
2.2.2 CIC-2 i leucodistròfia	31
2.2.2.1 Propietats biofísiques del canal CIC-2	31
2.2.2.2 Farmacologia i regulació de l'activitat de CIC-2	33
2.2.2.3 Funcions fisiològiques de CIC-2 i patologies associades	35
2.2.2.4 GlialCAM com a subunitat de CIC-2	38
<b>2.3 Fisiologia renal i de l'oïda interna</b>	41
2.3.1 Estructura de la nefrona	41
2.3.2 Reabsorció de sals	42
2.3.3 Cèl·lules ciliades i mecanotransducció en l'oïda interna	43
2.3.4 Sistema auditiu. Potencial endococlear	44
2.3.5 Enriquiment de potassi de la endolimfa	45
2.3.6 CIC-K i síndrome de Bartter	45

2.3.6.1 Propietats biofísiques dels canals CIC-K	45
2.3.6.2 Síndrome de Bartter	49
2.3.6.3 Farmacologia de CIC-K	50
<b>3. PEIX ZEBRA COM A MODEL ANIMAL</b>	<b>52</b>
<b>3.1 Models de peix zebra per l'estudi de miopaties</b>	<b>54</b>
<b>3.2 Tècniques d'edició genòmica</b>	<b>56</b>
<b>OBJECTIUS</b>	<b>65</b>
<b>MATERIALS I MÈTODES</b>	<b>69</b>
<b>1. TÈCNQUES DE BIOLOGIA MOLECULAR</b>	<b>71</b>
<b>1.1 Obtenció de bacteris electrocompetents i transformació del DNA</b>	<b>71</b>
1.1.1 Obtenció de bacteris electrocompetents d'alta eficiència	71
1.1.2 Transformació de bacteris	72
1.1.2.1 Mètode d'electroporació	72
<b>1.2 Obtenció i purificació de DNA plasmídic</b>	<b>73</b>
1.2.1 Minipreparacions	73
1.2.2 Midipreparacions	75
1.2.3 Quantificació del DNA	76
1.2.4 Seqüenciació del DNA	76
<b>1.3 Clonatge de DNA en un plàsmid</b>	<b>77</b>
1.3.1 Reacció de PCR	77
1.3.2 Reacció de PCR recombinant o mètode SOE ( <i>splicing by overlap extension</i> )	79
1.3.3 Clonació clàssica	80
1.3.3.1 Digestió amb enzims de restricció	80
1.3.3.2 Electroforesi del DNA en gel d'agarosa	81
1.3.3.3 Purificació del DNA	82
1.3.3.4 Tractament del DNA amb fosfatasa alcalina	83
1.3.3.5 Lligació	83

1.3.4 Clonació mitjançant el sistema <i>Gateway</i>	84
1.3.4.1 Clonatge mitjançant el sistema <i>Gateway</i> simple	84
1.3.4.2 Reacció <i>attB</i> x <i>attP</i> . Construcció de clons d'entrada ( <i>Entry clones</i> )	85
1.3.4.3 Reacció <i>attL</i> x <i>attR</i> . Construcció de vectors d'expressió	86
1.3.4.4 Clonatge mitjançant el sistema <i>Gateway Multisite</i> de dos fragments	86
1.3.4.5 Utilització del software <i>Vector NTI</i> per a la construcció virtual de clons	87
<b>1.4 Obtenció de RNA missatger i RT-qPCR</b>	87
1.4.1 Obtenció de RNA missatger a partir de teixits i de cultius cel·lulars	87
1.4.2 PCR de transcripció reversa i PCR quantitativa (qPCR)	89
<b>1.5 Extracció de DNA genòmic</b>	91
1.5.1 DNA a partir de l'aleta caudal ( <i>fin</i> o <i>tail clip</i> )	91
1.5.2 DNA a partir d'embrions	92
1.5.3 PCR de genotipat	93
1.5.3.1 SNP TaqMan Assay	93
1.5.3.2 <i>High-resolution melting analysis</i> (HRM)	94
<b>1.6 Síntesi de RNA <i>in vitro</i></b>	95
1.6.1 Síntesi de RNA amb caputxó ( <i>capped RNA</i> )	95
1.6.2 Síntesi de sondes de RNA	96
1.6.3 Síntesi de RNA guia (gRNA)	97
1.6.3.1 Síntesi de gRNA a partir del vector pDR274	97
1.6.3.2 Síntesi de gRNA sense clonar	98
<b>2. TÈCNiques DE BIOLOGIA DE PROTEÏNES</b>	100
<b>2.1 Obtenció de proteïna total</b>	100
2.1.1 Obtenció de la proteïna total a partir de cèl·lules i de teixit	100
2.1.2 Obtenció d'extracte de membrana total a partir de teixit	101
2.1.3 Determinació de la concentració proteica	102
<b>2.2 Assaig de Western blot</b>	104



<b>2.3 Obtenció d'anticossos policlonals</b>	108
2.3.1 Purificació de IgGs mitjançant afinitat per al pèptid	109
<b>2.4 Immunofluorescència</b>	111
<b>3. CULTIUS CEL·LULARS</b>	113
<b>3.1 Línies cel·lulars</b>	113
3.1.1 Condicions generals de cultiu per cèl·lules HeLa i HEK293	113
3.1.2 Tripsinització	113
3.1.3 Congelació de cèl·lules	114
3.1.4 Descongelació de cèl·lules	114
<b>3.2 Transfecció cel·lular</b>	114
3.2.1 Transfecció transitòria amb Transfectina (BioRad) en cèl·lules HeLa i HEK293	114
<b>3.3 Cultius primari de fibres musculars aïllades de peix zebra</b>	116
<b>4. TÈCNiques HISTOLÒGIQUES</b>	117
<b>4.1 Obtenció i processament d'embrions i teixits</b>	117
4.1.1 Obtenció d'embrions de peix zebra	117
4.1.2 Obtenció de teixits de peix zebra	118
4.1.3 Fixació d'embrions	118
4.1.4 Crioprotecció, inclusió i tall	119
<b>4.2 Tècniques de localització de RNA missatger</b>	120
4.2.1 Hibridació <i>in situ</i>	120
<b>4.3 Tècniques d'immunolocalització</b>	122
4.3.1 Immunofluorescència d'embrió sencer	122
4.3.2 Immunofluorescència per talls fins	123
<b>5. EDICIÓ GENÒMICA EN PEIX ZEBRA</b>	125
<b>5.1 Mutagènesi induïda per ENU</b>	125
<b>5.2 Edició genòmica dirigida amb CRISPR/Cas9</b>	125
<b>5.3 Transgènesi transitòria – Tol2</b>	126
<b>5.4 Injecció en embrions de peix zebra</b>	127
<b>6. TÈCNiques DE COMPORAMENT EN PEIX ZEBRA</b>	129

<b>7. ANNEX 1: SOLUCIONS D'ÚS GENERAL</b>	130
<b>8. ANNEX 2: PLÀSMIDS GENERATS PER BIOLOGIA MOLECULAR</b>	133
<b>9. ANNEX 3: LLISTA DE <i>PRIMERS</i></b>	135
<b>RESULTATS</b>	137
<b><u>CAPÍTOL 1. IDENTIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ DE CLCs EN EL PEIX ZEBRA</u></b>	139
<b>1. IDENTIFICACIÓ DE LES PROTEÏNES CLC EN EL GENOMA DEL PEIX ZEBRA</b>	141
1.1 Validació de les seqüències obtingudes de les bases de dades	144
1.2 Comparació de seqüències i anàlisi filogenètic	147
<b>2. PATRÓ D'EXPRESSIONI DELS CANALS CLC</b>	150
2.1 Expressió dels canals CIC en teixits adults	150
2.2 Expressió dels canals CIC en diferents estadis embrionaris	153
<b>3. GENERACIÓ D'ANTICOSSOS CONTRA LES PROTEÏNES DE PEIX ZEBRA</b>	155
3.1 Anticossos contra les proteïnes <i>clc-1a</i> i <i>clc-1b</i>	156
3.1.1 Localització de <i>clc-1a</i> en el múscul esquelètic	158
3.1.2 Localització de <i>clc-1b</i> en el múscul esquelètic	160
3.2 Anticossos contra les proteïnes <i>clc-2a</i> i <i>clc-2b</i>	161
3.3 Anticossos contra les proteïnes <i>clc-k</i> i <i>barttin</i>	165
<b>4. INTERACCIÓ DE LES PROTEÏNES CLC AMB LES SEVES SUBUNITATS</b>	166
4.1 Interacció de <i>clc-2</i> amb <i>GlialCAM</i>	166
4.2 Interacció de <i>clc-k</i> amb <i>barttin</i>	168
<b>5. CARACTERITZACIÓ ELECTROFISIOLÒGICA</b>	169
<b><u>CAPÍTOL 2. GENERACIÓ DE TRANSGÈNICS</u></b>	173
<b>1. PROMOTOR TEIXIT ESPECÍFIC DE MÚSCUL ESQUELÈTIC: <i>503unc</i></b>	175
1.1 Estudi de mutacions en el canal CIC-1 identificades en pacients amb Miotonia congènita	176
1.2 Estudi de la localització de les proteïnes <i>clc-1a</i> i <i>clc-1b</i> fusionades a proteïnes fluorescents	177

<b><u>CAPÍTOL 3. GENERACIÓ DE MODELS ANIMALS EN PEIX ZEBRA</u></b>	179
1. MODEL DE <i>KNOCK DOWN</i> DE <i>clcn1a</i> I <i>clcn1b</i>	181
2. MODELS DE PÈRDUA DE FUNCIÓ	184
2.1 Generació de línies <i>knock out</i> per <i>clcn1a</i> amb CRISPR/Cas	185
2.1.1 Validació de les línies mutants generades	189
2.2 Generació de línies <i>knock out</i> per <i>clcn1b</i>	191
2.2.1 Obtenció de l'al·lel <i>clcn1b</i> <sup>sa13816</sup>	191
2.2.2 Generació de línies <i>knock out</i> per <i>clcn1b</i> amb CRISPR/Cas	196
2.3 Generació d'una línia <i>knock out</i> doble per <i>clcn1a</i> i <i>clcn1b</i>	197
<b><u>CAPÍTOL 4. ESTUDIS DE COMPORTAMENT EN LARVES</u></b>	199
1. DESENVOLUPAMENT D'UN PROTOCOL D'ESTÍMULS ADEQUAT	201
2. ESTUDI DEL MOVIMENT DE LES LÍNIES MUTANTS	203
<b>DISCUSSIÓ</b>	207
<b>CONCLUSIONS</b>	223
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	227
<b>PUBLICACIONS</b>	261

# **ABREVIATURES**



<b>9-AC</b>	9-carboxílic antracè
<b>APS</b>	Persulfat d'amoni
<b>ATP</b>	Trifosfat d'adenosina
<b>BCA</b>	Àcid bicinconínic
<b>BSA</b>	Albúmina sèrica bovina
<b>cAMP</b>	Monofosfat d'adenosina cíclic
<b>Cas</b>	CRISPR- <i>associated</i>
<b>CBS</b>	Cistationina- $\beta$ -sintasa
<b>CCT</b>	Túbul col·lector cortical
<b>cDNA</b>	DNA complementari
<b>CFTR</b>	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
<b>CPP</b>	Àcid 2-(p-clorofenoxi) propionic
<b>CRISPR</b>	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
<b>crRNA</b>	RNA CRISPR
<b>CT</b>	Túbul conector
<b>DNA</b>	Àcid desoxiribonucleic
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfòxid
<b>DAPI</b>	4',6'-diamino-2-fenilindol
<b>DCT</b>	Túbul contornejat distal
<b>DEPC</b>	Dietil pirocarbonat
<b>DGC</b>	Complex distrofina-glicoproteïna
<b>DHPR</b>	Receptor de dihidropiridina
<b>DNasa</b>	Desoxirribonucleasa
<b>D.O.</b>	Densitat òptica
<b>DPC</b>	Difenilamina-2-carboxilat
<b>dpf</b>	Dies post-fertilització
<b>ECL</b>	Substrat quimioluminiscent de luminol
<b>E. Coli</b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EDTA</b>	Àcid 2-({2-[bis(carboximetil)amino]etil}(carboximetil)amino) acètic
<b>ENU</b>	Etilnitrosourea
<b>FBS</b>	Sèrum boví fetal
<b>GFP</b>	Proteïna verda fluorescent
<b>GABA</b>	Àcid gamma-aminobutíric
<b>HDR</b>	Reparació dirigida per homologia
<b>HRM</b>	<i>High resolution melting</i> , o desnaturalització d'alta resolució
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rave
<b>ICT</b>	Túbul conector inicial

<b>Ig</b>	Immunoglobulina
<b>KCC</b>	Cotransportador de potassi i clorur
<b>LKPAT</b>	Leucoencefalopatia amb evidències de microvacuolització de la mielina
<b>MCD</b>	Túbul col·lector medul·lar
<b>MRI</b>	Imatge per ressonància magnètica
<b>mRNA</b>	RNA missatger
<b>NCC</b>	Cotransportador de sodi i potassi
<b>NFA</b>	Àcid niflúmic
<b>NHEJ</b>	Unió d'extrems no homòlegs
<b>NKCC</b>	Cotransportador de sodi, potassi i clorur
<b>NPPB</b>	Àcid 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino) benzoic
<b>NTPs</b>	Nucleòsids trifosfat
<b>O.C.T.</b>	Medi viscos per congelació de teixits
<b>PAM</b>	Motiu adjacent al <i>protospacer</i>
<b>PBS</b>	Tampó fosfat salí
<b>PCR</b>	Reacció en cadena de la polimerasa
<b>PCT</b>	Túbul proximal contornejat
<b>PFA</b>	Paraformaldehid
<b>PKA</b>	Proteïna quinasa A
<b>PKC</b>	Proteïna quinasa C
<b>PMSF</b>	Florur de fenilmetilsulfonil
<b>PST</b>	Túbul proximal recta
<b>qPCR</b>	PCR quantitativa o a temps real
<b>RFP</b>	Proteïna fluorescent vermella
<b>RNasa</b>	Ribonucleasa
<b>RNA</b>	Àcid ribonucleic
<b>RT-PCR</b>	Reacció en cadena de la polimerasa amb transcriptasa reversa
<b>RyR</b>	Receptor de rianodina
<b>SDS</b>	Dodecilsulfat sòdic
<b>sgRNA</b>	RNA guia únic
<b>SITS</b>	Àcid 4-acetamido-4'-isothiocianat-stilbene-2,2'-disulfònic
<b>TAE</b>	Tampó Tris-acetat-EDTA
<b>TAL</b>	Branca gruixuda ascendent de la nança de Henle
<b>TALEN</b>	<i>Transcription activator-like effector nucleases</i>
<b>tALH</b>	Branca prima ascendent de la nança de Henle
<b>TBS</b>	Tampó Tris-salí
<b>tDLH</b>	Branca prima descendent de la nança de Henle

<b>TEMED</b>	Tetrametiletilendiamina
<b>TILLING</b>	<i>Targeting induced local lesions in genomes</i>
<b>TMX</b>	Tamoxifen
<b>tracrRNA</b>	Transactivador del crRNA
<b>TTBS</b>	TBS-Tween 20
<b>UTR</b>	Regió no traduïda d'un mRNA
<b>VRAC</b>	<i>Volume regulated anion channels</i>
<b>WT</b>	<i>wild-type</i>
<b>ZFN</b>	Nucleases <i>zinc-finger</i>





# **INTRODUCCIÓ**



# 1. Homeòstasi iònica

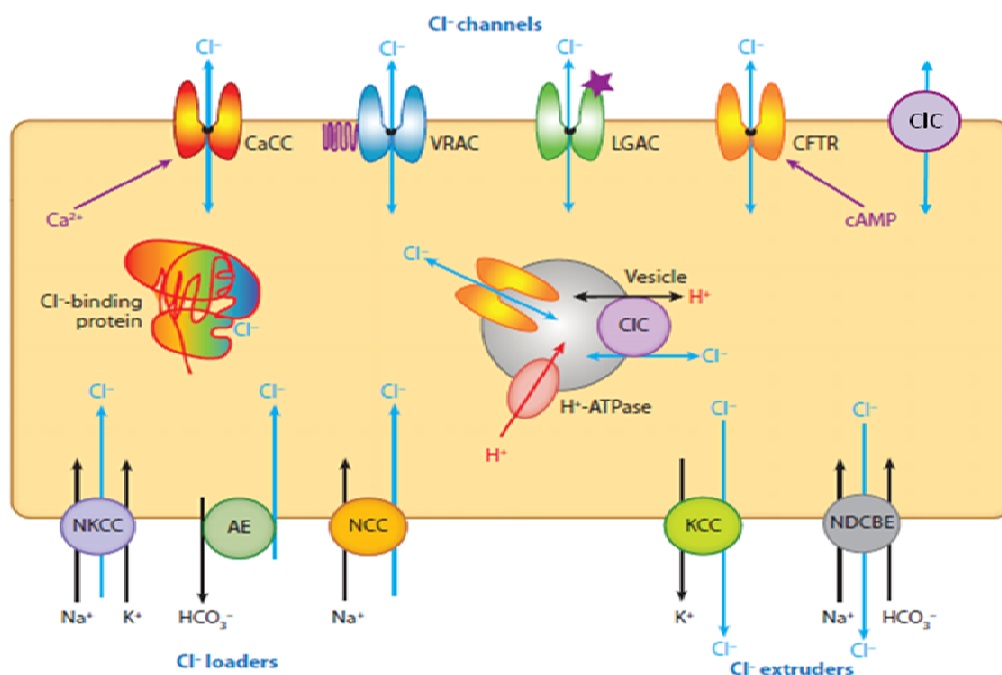
Totes les cèl·lules, des dels organismes procariotes fins les cèl·lules que componen els òrgans i sistemes d'organismes superiors, viuen envoltades per un entorn sempre canviant al qual s'han d'adaptar contínuament per assegurar-ne la seva supervivència. La homeòstasi comprèn tot un conjunt de mecanismes per tal de controlar diferents paràmetres vitals, com poden ser la temperatura corporal, el nivell de glucosa en sang i molt important especialment a nivell cel·lular, les concentracions d'ions inorgànics com el  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  essencials per la generació i repolarització de potencials d'acció, respectivament. Importants també el  $\text{Ca}^{2+}$ , com a segon missatger en cascades de senyalització cel·lular o el  $\text{Cl}^-$ , implicat en el control de l'excitabilitat de les cèl·lules musculars i transport transepitelial.

Les cèl·lules estan envoltades per una membrana formada per una bicapa lipídica que serveix d'aïllament entre els medis extracel·lular i intracel·lular, evitant que els components d'un compartiment difonguin passivament cap a l'altre. La membrana plasmàtica és impermeable a molècules grans com àcids nucleics o proteïnes i permeable de manera selectiva a molècules petites com els ions i altres metabòlits. Aquesta selectivitat iònica vé donada per la presència de proteïnes inserides en la membrana anomenades bombes, transportadors i canals iònics, els quals tenen la capacitat de modular el flux d'entrada o sortida d'ions en la cèl·lula. Hi ha dos tipus de transport, passiu i actiu. El transport passiu està mediat pels canals iònics i permet la difusió passiva d'ions a favor de gradient. El transport actiu permet el moviment d'ions i altres soluts en contra de gradient. Dins el transport actiu es diferencien dos subtipus: transport actiu primari (bombes) i transport actiu secundari (transportadors). Les bombes es beneficien de l'energia alliberada en la hidròlisi d'ATP per moure ions en contra de gradient electroquímic mentre que els transportadors acoplen el moviment d'un ió en contra de gradient amb el d'un ió o varis a favor de gradient.

## 1.1 Canals i transportadors

Dels estudis fets prèviament en canals catiónics es pot concloure que comparteixen certs trets comuns. En canvi, de totes les proteïnes conegudes amb capacitat de conduir  $\text{Cl}^-$ , ja siguin canals o transportadors, només es pot dir que comparteixen una baixa selectivitat aniònica. A més de  $\text{Cl}^-$ , permeten el pas d'altres anions inorgànics com el  $\text{Br}^-$  i el  $\text{I}^-$  i en alguns casos anions orgànics. No obstant, se'ls anomena canals de clorur perquè és l'anió més abundant i la permeabilitat a aquest ió és molt més elevada. S'han identificat nombroses proteïnes amb capacitat de transportar clorur cap

a l'interior de la cèl·lula com el cotransportador NKCC, l'intercanviador AE (moviment de  $\text{Cl}^-$  acoplat a  $\text{HCO}_3^-$ ) i el cotransportador NCC ( $\text{Na}^+$ - $\text{Cl}^-$ ) o cap l'exterior de la cèl·lula com els cotransportadors KCC ( $\text{K}^+$ - $\text{Cl}^-$ ) i l'intercanviador NDCBE (moviment de  $\text{Cl}^-$  acoplat a  $\text{HCO}_3^-$  dependent de  $\text{Na}^+$ ). A més, altres proteïnes permeten el transport de  $\text{Cl}^-$  a través de la membrana plasmàtica i n'hi ha que són dependents de  $\text{Ca}^{2+}$  (com els canals Ano1 i Ano2), de lligant (com els receptors de glicina i GABA) i de cAMP (com el CFTR), regulats pel volum cel·lular, el desconegut VRAC que finalment a mitjans de l'any 2014 es va identificar que la seva identitat molecular està formada per heteròmers de les proteïnes LRRC8 (Voss et al, 2014; Qiu et al, 2014) i dependents de voltatge (proteïnes CIC). També s'ha detectat la presència d'alguns membres de la família CIC en la membrana d'òrgànuls intracel·lulars (Figura 1).



**Figura 1.** Canals i transportadors de clorur. Modificat de Duran et al, 2010.

Tot i la dificultat d'establir una classificació de totes les proteïnes conegudes, s'ha decidit separar-les en 5 famílies: canals aniònics dependents de lligand, CFTR, CICs, bestrofines i TMEM16A/anoctamines. No obstant, s'ha de tenir en compte que no totes les proteïnes de la família CIC són canals, sinó que n'hi ha que són intercanviadors  $\text{Cl}^-$  / $\text{H}^+$  i que no tots els membres de la família TMEM16/anoctamina són canals de clorur activats per  $\text{Ca}^{2+}$ .

## 1.2 Família CIC

L'any 1990, Thomas Jentsch va aconseguir clonar una proteïna de membrana amb capacitat de conduir clorur de l'òrgan elèctric del peix *Torpedo marmorata* i la va anomenar CIC-0 (Jentsch et al, 1990). A través de l'anàlisi de seqüències per homologia va ser capaç d'identificar altres membres de la mateixa família i que aquestes estan altament conservades en tots els fílums, des de bacteris fins a l'ésser humà. Així doncs, en mamífers s'ha identificat fins a 9 membres, anomenats CIC-1 a CIC-7 i CIC-Ka i CIC-Kb (Figura 2).

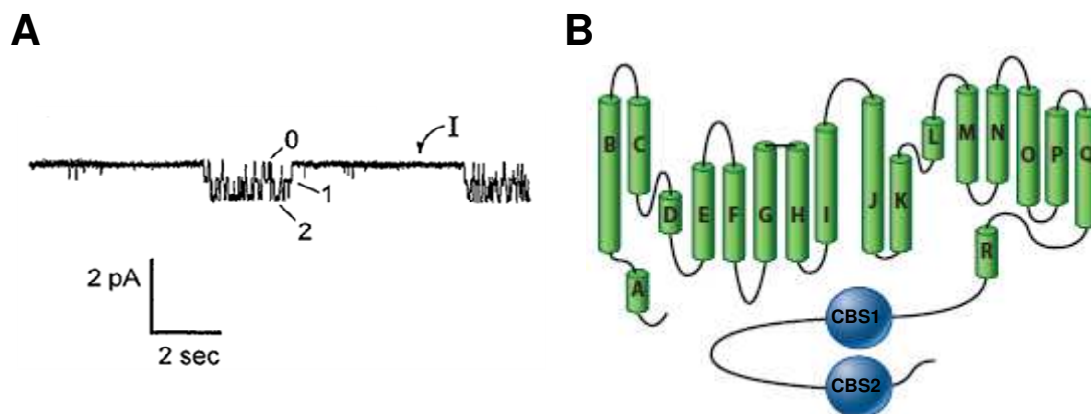
	$\beta$ -subunit	expression	function	human disease	mouse model
Cl <sup>-</sup> channel plasma membrane	CIC-1	skeletal muscle	stabilization of membrane potential	myotonia congenita	myotonia congenita ( <i>adr</i> mouse)
	CIC-2 ( <i>GlialCAM</i> ) wide	wide	transepithel. transport regulation extracellular ions, cell volume?	leukodystrophy azoospermia	degener. retina / testes leukodystrophy
	CIC-Ka <b>barttin</b>	kidney, ear	transepithelial transport	Bartter (renal salt loss)	diabetes insipidus
	CIC-Kb	kidney, ear	transepithelial transport		
Cl <sup>-</sup> /H <sup>+</sup> antiport vesicles (endo/lyso)	CIC-3	wide (brain, kidney, liver...)	ion homeostasis of (late) endosomes		degeneration: retina / hippocampus
	CIC-4	wide (brain, kidney, muscle...)	ion homeostasis of endosomes	mental retardation	nothing obvious
	CIC-5	kidney intestine...	ion homeostasis of early/recycl. endosomes	Dent's disease	impaired renal endocytosis
	CIC-6	neuronal	ion homeostasis of late endosomes ?		lysosomal storage (NCL)
	CIC-7 <i>Ostm1</i> wide	wide	acidify of osteoclast resorption lacuna / lysosomal ion homeostasis	osteopetrosis retinal degeneration NCL	osteopetrosis retinal degeneration NCL

**Figura 2.** Classificació de la família CIC de mamífers. S'indica el teixit on s'ha trobat la seva expressió, funcions, malalties relacionades amb alteracions de la seva activitat, els models de ratolí generats i les subunitats accessòries identificades. Extret de Jentsch, 2015.

En un principi es va assumir que tots eren canals, però ara se sap que: 1) CIC-1, CIC-2 i CIC-Ka/b són canals de clorur, es troben en la membrana plasmàtica i la seva funció és la d'estabilitzar el voltatge de cèl·lules excitable i el transport de sals, 2) CIC-3 a CIC-7 es troben en compartiments intracel·lulars (endosomes i lisosomes) actuant com a intercanviadors 2Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup>. S'hipotetiza que aquests CICs intracel·lulars compensen el corrent elèctric produït per una bomba de protons permetent l'acidificació d'aquests orgànuls (Picollo i Pusch, 2005; Scheel et al, 2005), però treballs posteriors realitzats amb CIC-7 van suggerir que el seu paper és el de facilitar l'acidificació de les vesícules degut a que desplacen el potencial de la llum vesicular cap a potencials més negatius (Weinert et al, 2010). No obstant, es desconeix si aquesta acumulació de clorur té

algún altre paper rellevant (Novarino et al, 2010). Comparteixen la selectivitat aniònica  $\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^-$  i una baixa permeabilitat catiònica.

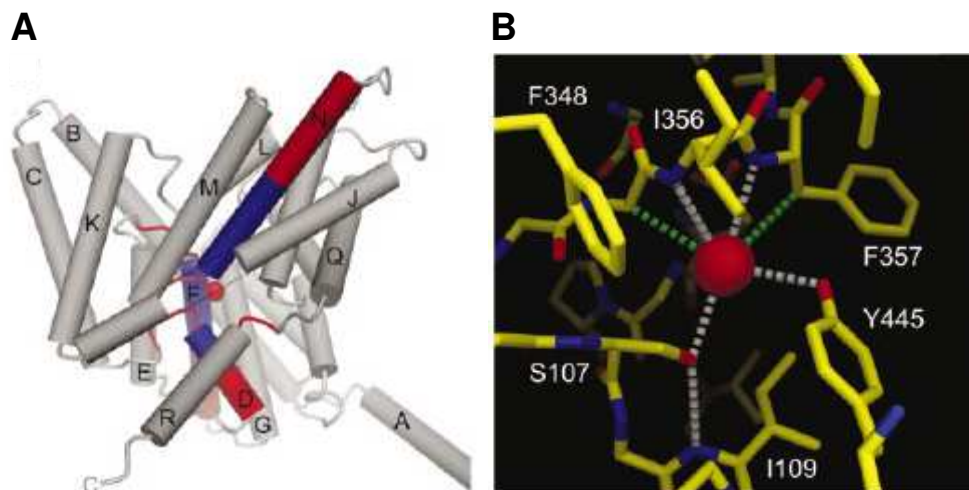
Els primers registres de canal únic suggerien que aquestes proteïnes eren funcionals quan es trobaven en forma de dímers, ja que en aquests s'observaven tres configuracions diferents: una d'elles sense activitat elèctrica (corresponent a una configuració tancada del canal) i dues amb activitat elèctrica en el qual l'estat de màxima activitat presenta el doble d'amplitud de l'estat intermig (Figura 3A) (Miller, 1982; Chen i Miller, 1996). A més, aquests resultats indicarien dos mecanismes d'obertura, un de comú dels dos canals (anomenat *common* o *slow gate*) i un mecanisme d'obertura independent entre els dos canals (anomenat *fast gate*) (White i Miller, 1979; Miller i White, 1980). Aquesta idea va ser validada quan es van aconseguir cristalitzar els homòlegs de *S. typhimurium* (StClC) i *E. coli* (EcClC) (Dutzler et al, 2002). Així com en els canals de  $\text{K}^+$  són necessàries 4 subunitats acoplades per formar un únic porus en la interfície entre les subunitats, gràcies a l'estructura d'alta resolució s'ha pogut veure com es posicionen dues subunitats de ClC. Cada subunitat està formada per 18 hèlix intramembrana, anomenades de la A a la R, i un llarg fragment intracel·lular que posseeix dos dominis cistationina- $\beta$ -sintasa (CBS) (Figura 3B).



**Figura 3.** **A** Registres de canal únic de ClC-0 realitzat a  $-20\text{mV}$  on s'observen els estats del canal: inactivat (0), una subunitat activa (1) i les dues subunitats actives (2) Els períodes llargs d'inactivació s'indiquen amb I (Extret de Chen i Miller, 1996) . **B** Estructura d'una subunitat de ClC. En verd estan representades les 18 hèlix i en blau els dos dominis CBS. Modificat de Duran et al, 2010.

Les hèlix que formen part de la interfície entre les dues subunitats són les hèlix H, I, P i Q. Aquestes s'encaren antiparal·lelament i cada una d'elles forma el seu propi porus gràcies a la orientació inclinada i interacció de les hèlix transmembrana de manera que certs aminoàcids d'aquestes hèlix queden exposats cap al centre de la subunitat. Aquests aminoàcids són clau per formar el filtre de selecció iònica i per conduir el clorur a través del porus. Una altra particularitat és que no totes les hèlix atravessen

completament la membrana, són de longitud variable i es troben lleugerament inclinades. Els llocs d'unió iònica estan conservats entre diferents espècies (inclosos els bacteris) i presenten les següents seqüències: GSGIP (aminoàcids 106-110), G(K/R)EGP (146-150), GXFXP (355-359) i la Tyr 445, pertanyents a les hèlix D, F, N i R, respectivament (les posicions dels residus corresponen al canal StCIC). L'extrem N-terminal d'aquestes hèlix està carregat positivament de manera que es genera un entorn electrostàtic favorable per la interacció amb anions. Concretament, l'ió  $\text{Cl}^-$  és coordinat a través del porus gràcies a la interacció amb els aminoàcids Ile 356, Phe 357, Ser 107 i Tyr 445 (Figura 4). Aquests aminoàcids formen ponts d'hidrogen entre ells de manera que el  $\text{Cl}^-$  pot interaccionar amb les càrregues positives parcials degut als moments dipol de les hèlix, de manera que no s'uneix fortament i això permet una alta taxa de difusió d'ions.

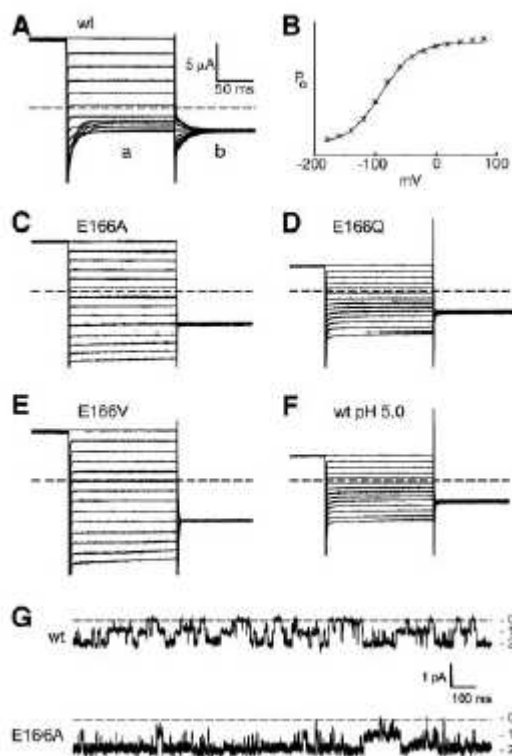


**Figura 4.** Estructura del filtre de selecció iònica. **A** Representació de la orientació de les hèlix. En blau s'indica els extrems positius (N-terminal) i en vermells els negatius (C-terminal) de les hèlix D, F i N. Els aminoàcids implicats en la formació del filtre de selecció iònica són els loops indicats en vermell, envoltant un ió  $\text{Cl}^-$  (esfera vermella). **B** Detall de les interaccions dels residus del filtre de selecció. En línies discontinües blanques s'indiquen els ponts d'hidrogen i en verd interaccions hidrofòbiques. L'esfera vermella representa un ió  $\text{Cl}^-$ . Extret de Dutzler et al, 2002.

Un altre descobriment gràcies a l'estructura de Dutzler et al, és la del paper de l'aminoàcid Glu148 (més endavant se l'anomenaria "*gating glutamate*"). Mirant l'estructura del canal, a primer cop de vista pot semblar estrany que hi hagi una càrrega negativa orientada cap al porus, ja que estaria bloquejant el pas de conducció generant una força de repulsió amb el  $\text{Cl}^-$ . No obstant, el fet que estigui conservat en gairebé tots els canals CIC podria implicar aquest residu en alguna funció essencial en el funcionament del canal. Perquè es porti a terme el pas d'ions, el grup hidroxil del glutamat, d'alguna manera, s'hauria de desplaçar. Pensant que es tractaria d'un cristall d'un canal en configuració tancada, es van fer els següents experiments. Davant la impossibilitat de realitzar estudis electrofisiològics amb els canals CIC bacterians, van decidir utilitzar el canal CIC-0 perquè ja havia sigut àmpliament estudiat i gràcies a un alt grau de conservació del filtre de selecció. Així doncs van generar els mutants



E166A, E166Q i E166V (sent el E166 l'equivalent al E148 del canal bacterià) i en van registrar la seva activitat. El canal CIC-0 WT és un canal dependent de voltatge inhibït per hiperpolarització (potencials de membrana negatius) i s'obre per despolarització (potencials de membrana positius) (Figura 5B). A mesura que el potencial es torna negatiu s'observa el tancament del *fast gate* degut a la reducció gradual de corrents *inward* (Figura 5A). És interessant veure que els mutants són igualment funcionals però no presenten la reducció de les corrents *inward* a potencials negatius, suggerint una alteració del *fast gating* (Figura 5C-E). Aquest fet és encara més evident a nivell de registres de canal únic, on s'observa que ambdós porus del mutants es mantenen oberts gran part del temps d'estudi (Figura 5G). No obstant, en algú punt sí s'observa el tancament d'un dels porus del mutant i més rarament el tancament dels dos. Aquest experiments van demostrar que, efectivament, el glutamat té un paper clau en el *gating* del canal. Un altre fet molt interessant és l'efecte del pH extracel·lular sobre l'activitat del canal WT, el qual presenta un perfil d'activitat molt similar al dels mutants en pH àcids (Figura 10F).



**Figura 5.** Efecte de la mutació del E166 en la dependència de voltatge en el canal CIC-0. **A** Registres whole cell del canal WT. **B** Probabilitat d'obertura del canal WT. **C-E** Registres whole cell de les mutacions a alanina, glutamina i valina. **F** Registres whole cell del canal WT en pH àcid (pH=5). **G** Registres de canal únic de CIC-0 i el mutant E166A. Extret de Dutzler et al, 2002.

En l'article de Chen et al (Chen i Chen, 2001) fan un estudi molt detallat sobre l'efecte del pH en el *fast gating* dels canals CIC en el que demostren que aquest té un efecte només en la obertura del canal. Això explicaria el paper del glutamat en el *gating* del canal a través del seu estat de protonació. Si el grup hidroxil del glutamat està desprotonat, aquest forma ponts d'hidrogen amb els residus més propers i bloqueja el porus (canal tancat), en canvi, si el grup hidroxil es troba protonat p. ex. degut a un

entorn àcid) és probable que pateixi un canvi de conformació tal que deixés lliure el porus i permetés el flux d'ions. Així doncs, aquest glutamat proporciona la propietat de la dependència de voltatge. Els canals CIC-K, els quals són actius tant a voltatges positius com negatius, presenten una valina.

Una alta concentració de  $\text{Cl}^-$  a l'espai extracel·lular afavoreix la obertura dels canals. El  $\text{Cl}^-$  competeix amb el glutamat per aquest lloc d'unió i és capaç de desplaçar-ne el seu grup hidroxil.

En aquest moment semblava més o menys clar el mecanisme de *gating* del canals CIC, però com és aquest mecanisme en els transportadors, en els quals el transport de  $\text{Cl}^-$  va acoplat al de  $\text{H}^+$ ? En els anys posteriors es van realitzar un conjunt d'experiments que van aportar un raig de llum per respondre aquesta pregunta. Tot va començar quan Accardi et al. van aconseguir expressar la proteïna ecCIC en bicapes lipídiques i, per primer cop, fer-ne un estudi electrofisiològic (Accardi et al, 2004). Això els va permetre fer el sorprenent descobriment que ecCIC no era només un canal de clorur com es creia fins ara, sinó que era un intercanviador  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$  (Accardi i Miller, 2004). Específicament, el moviment de 2  $\text{Cl}^-$  va acoplat al de un  $\text{H}^+$ . Van veure que si mutaven el E148 per alanina, es perd el transport acoplat i l'intercanviador es convertia en un canal, conduïnt només  $\text{Cl}^-$  (Accardi i Miller, 2004). A més, van descobrir que per conduir el  $\text{H}^+$  a través de la proteïna, era necessari un altre glutamat, E203 (també anomenat "*proton glutamate*"), proper a la part intracel·lular de la proteïna (Accardi et al, 2005). Aquest residu està conservat en tots els transportadors d'aquesta família mentre que els canals presenten una valina en aquesta posició. La neutralització d'aquest glutamat aboleix el transport de protons i la proteïna es converteix de nou en un canal de clorur. Aquests resultats confirmen la importància d'aquest residu pel transport de  $\text{H}^+$ , tot i que era esperable que també es perdés el del  $\text{Cl}^-$  (Accardi et al, 2005). En canvi, sí es va observar aquest efecte al neutralitzar el "*proton glutamate*" de les proteïnes CIC-4 (E281A) i CIC-5 (E268A) (Zdebik et al, 2008). Tant el transport de  $\text{H}^+$  com de  $\text{Cl}^-$  es va abolir, però sorprenentment només les corrents de  $\text{Cl}^-$  són recuperades si en aquests mutants també se'ls neutralitza el "*gating glutamate*". Aquest resultat suggereix que les proteïnes natives només transporten clorur si presenten un aport de protons citoplasmàtic (Zdebik et al, 2008). Zdebik et al. també van observar que la substitució del "*proton glutamate*" per altres residus protonables (p. ex. l'aspartat), també permetia el transport de clorur i protons. Les proteïnes CIC-4 i CIC-5 també es converteixen en canals de clorur quan es neutralitza el "*gating glutamate*" (Picollo i Pusch, 2005; Scheel et al, 2005).

A principis del 2017, el laboratori de MacKinnon ha aconseguit cristal·litzar un altre CIC, en aquest cas el CIC-K boví, aportant més diferències estructurals entre canals i transportadors de la mateixa família (Park et al, 2017). Això ha permès identificar una nova estructura que, per comparació de seqüències, es trobaria present només en els canals CIC i no en transportadors. Es tracta d'un segment extracel·lular que connecta les hèlix K i M, i resulta interessant perquè certes mutacions en CIC-1 i CIC-Kb que provoquen malaltia es troben en aquesta regió.

És important destacar que l'extrem carboxiterminal de la hèlix R és intracel·lular i, en tots els CICs d'eucariotes, està seguit d'un fragment intracel·lular que presenta dos dominis CBS. Els dominis CBS es troben presents en tots els regnes, des de *archaea* fins a eucariotes. Formen part d'una gran varietat de proteïnes i tenen un paper regulador, ja sigui d'oligomerització, de *gating* de canals o de sensors de metabòlits intracel·lulars (Ignoul i Eggermont, 2005). Mutacions en aquests dominis poden provocar l'aparició de malalties, com la retinitis pigmentosa o la miotonia congenita (Ignoul i Eggermont, 2005).

Estudis en els quals s'ha deletat part d'aquesta regió C-terminal (concretament el segon CBS) tant en la proteïna CIC-0 com CIC-1 s'observa una pèrdua de funció. Sorprenentment, es pot recuperar l'activitat si es coexpressa la proteïna truncada amb el domini CBS2 (Schmidt-Rose and Jentsch, 1997; Maduke et al, 1998). També s'ha descrit que mutacions en alguns residus d'aquests dominis afecten al *common gating* (Estévez et al, 2004). A més d'un paper regulador, també tenen una funció estructural. Els dominis CBS1 i CBS2 d'una mateixa subunitat interaccionen entre ells mateixos en la mateixa subunitat i dimeritzen amb els de l'altre subunitat a través de la interacció CBS2-CBS2. Aquesta interacció ha estat confirmada per cristal·lografia del C-terminal de la proteïna CIC-Ka (Markovic i Dutzler, 2007). Recentment, s'ha demostrat que la fosforilació/desfosforilació de dos residus de serines (Ser742 i Ser747) entre els dos dominis CBS de l'homòleg CLH-3b de *C. elegans* regula la inactivació/activació del canal (Yamada et al, 2016). La fosforilació d'aquests dos residus comporta un canvi conformacional dels dominis CBS que és transduït a les hèlix H i I, les quals també patiran un canvi conformacional ocasionant una disminució de l'activitat del canal. La deleció del fragment que conté les serines (anomenat domini actiu o AD) provoca que el canal es mantingui en estat inactiu, però, igual que en els estudis de deleccions del C-terminal en CICs, la coexpressió de CLH-3b inactiu amb el fragment AD, és capaç de recuperar l'activitat del canal (Yamada et al, 2016). Aquest mateix grup, en un altre treball publicat també a finals del 2016, van demostrar que la presència de dos residus

en el *loop* que connecta les hèlix H i I són imprescindibles perquè es transdueixi el canvi conformacional dels CBS a les hèlix (Yamada i Strange, 2016). Aquests residus són la valina 228, conservada en els canals CIC (mentre que en els transportadors CIC presenten un glutamat) i la tirosina 529. A més, estudis anteriors en els quals s'ha mutat aquests dos residus en CIC-0 i CIC-1 s'ha observat la pèrdua del *common gate*, suggerint un paper d'aquests aminoàcids en aquest mecanisme d'obertura (Bennetts i Parker, 2013; Cederholm et al, 2010).

Avui dia s'han identificat fins a tres proteïnes com a subunitats pels CIC, GlialCAM, Barttin i Ostm1 (Estévez et al, 2001; Lange et al, 2006; Jeworutzki et al, 2012). Així com Barttin i Ostm1 són imprescindibles pel correcte tràfic intracel·lular i funcionament dels canals CIC-Ka/b i CIC-7, respectivament, GlialCAM només modula l'activitat del canal CIC-2 i en modifica la seva localització cel·lular (Estévez et al, 2001; Lange et al, 2006; Jeworutzki et al, 2012).

Les malalties ocasionades per mutacions en les proteïnes CIC i en les seves subunitats han permès elucidar el paper fisiològic d'aquesta nombrosa família. Per ara se sap que cinc dels nou membres estan mutats en diverses malalties genètiques humanes com també les seves subunitats. La generació d'animals en els quals s'ha disruptit la funció d'aquestes proteïnes també ha ajudat a avançar en el coneixement de les seves funcions. En alguns casos han aportat nova informació sobre la seva funció fisiològica.

## 2. Clorur en la fisiologia cel·lular

L'estudi de la fisiologia es va centrar primerament en entendre com ions com el sodi, el potassi, el calci, i altres, regulen el correcte funcionament cel·lular. Gràcies a això es van fer grans avenços en aquesta àrea de coneixement, com el paper del sodi ( $\text{Na}^+$ ) en la despolarització i generació de potencials d'acció en les neurones, el paper del potassi ( $\text{K}^+$ ) en repolaritzar aquestes neurones, el paper del calci ( $\text{Ca}^{2+}$ ) com a missatger intracel·lular, ... En canvi, el clorur ( $\text{Cl}^-$ ), l'anió predominant en els sistemes biològics, es creia que sempre es trobava en equilibri electroquímic (Coombs et al, 1955), motiu pel qual no va ser estudiat detalladament fins els anys 90. Fins i tot el fet de descobrir que el clorur és secretat a l'estómac (Hogben, 1959) o que es transporta activament en l'axó dels calamars (Keynes, 1963), no va aconseguir incrementar-ne el seu interès. No obstant, es van convertir en el punt de mira d'alguns laboratoris gràcies a la implicació i clonació de dos canals de clorur en dues malalties humanes. Aquests van ser el canal CFTR, el qual provoca fibrosi quística (Kerem et al, 1989; Riordan et al, 1989; Rommens et al, 1989), i el canal  $\text{ClC-1}$ , que provoca miotonia congènita (Koch et al, 1992; Steinmeyer et al, 1991). Així doncs, citant dues edicions d'un dels llibres més importants de canals iònics, "Ionic channels of excitable membranes" escrit per Bertil Hille l'any 1984, es va passar de "Cl<sup>-</sup> channels have uncertain physiological significance in many cell types" a principi dels anys 90 a "Cl<sup>-</sup> channels have multiple functions" a l'any 2001.

Avui dia ja s'ha demostrat que el clorur pot ser transportat activament i que es troba fora de l'equilibri electroquímic, de manera que pot dur a terme diferents funcions, inclòs de senyalització. Per exemple, en les cèl·lules epitelials, l'alta concentració intracel·lular de clorur permet la secreció de fluids quan el clorur difon passivament i aquest moviment és acompanyat de sodi i aigua (Reeves i Androli, 1992). A més, es creu que el clorur també podria actuar com a segon missatger i regular una gran diversitat de proteïnes sensibles a la concentració de clorur, com la quinasa WNK, que activaria el cotransportador de  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$  NKCC1 (Kahle et al, 2008; Ponce-Coria et al, 2008), enzims implicats en metabòsime com la glucosa-6-fosfatasa (Pederson et al, 1998), proteïnes G (Nakajima et al, 1992), proteïnes implicades en la cascada de coagulació (Di Stasio, 2004), entre d'altres.

### 2.1 Fisiologia muscular

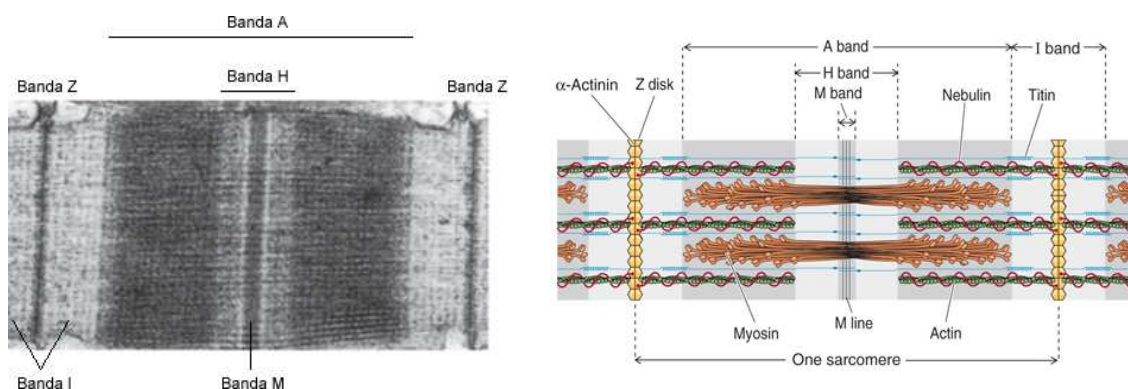
El sistema muscular, conjuntament amb el sistema esquelètic, és responsable del moviment gràcies a la seva capacitat de contracció i relaxació. Hi ha 3 tipus de múscul:

el múscul llis (present en els vasos sanguinis) i el múscul estriat que alhora es divideix en cardíac (present en el cor) i esquelètic (músculs adherit als ossos i que permeten el moviment, ja sigui per desplaçar-se o per funcions tan vitals com respirar). A continuació s'explicarà la fisiologia del tipus estriat esquelètic.

### 2.1.1 Estructura del múscul esquelètic

Els músculs estan envoltats per una capa de teixit connectiu anomenada epimisi i s'adhereixen als ossos mitjançant els tendons. Cada múscul conté un nombre diferent de cèl·lules o fibres musculars, però en tots ells aquestes fibres s'agrupen formant fascicles, els quals es troben envoltats per una altra capa de teixit connectiu anomenada perimisi. Cada fibra muscular és envoltada individualment per una tercera capa de teixit connectiu, l'endomisi. El teixit connectiu és de gran importància per les cèl·lules musculars perquè els aporta la resistència necessària per suportar el procés de contracció muscular, a més de servir com a zona de pas pel teixit nerviós i vasos sanguinis que inerven a les fibres musculars.

A més, en el múscul estriat, les fibres presenten una estructura cilíndrica anomenada miofibrilla formada per filaments d'actina i miosina disposats en paral·lel respecte la posició de la fibra i que permeten la contracció muscular al escurçar el sarcòmer. Aquestes miofibrilles estan formades per repeticions de sarcòmers, la unitat bàsica, anatòmica i funcional del múscul estriat. En un microscopi electrònic, s'observa que el sarcòmer presenta una estructura formada per bandes fosques i clares alternants (Figura 6), distingint diferents parts.



**Figura 6.** Estructura d'un sarcòmer. A l'esquerra, imatge obtinguda per microscopia electrònica. A la dreta, representació amb els filaments primers d'actina i gruixuts de miosina, a més d'altres components com la nebulina i la titina. Extret de Boron i Boulpaep, 2012.

La banda Z es compon per  $\alpha$ -actinina i és la banda més fosca en posició perpendicular a la direcció de la fibra muscular (delimita la longitud del sarcòmer). La banda I es troba envoltant la banda Z i presenta els filaments primers d'actina. La banda

A conté tot el filament gruixut de miosina, el qual es troba en proximitat amb els filament d'actina. La banda H és la regió en la que els filaments de miosina no estan en contacte amb els d'actina. Per microscopia, la banda H és la regió més clara. Finalment, s'identifica la banda M situada al mig de la zona H. La superposició dels filaments primis i gruixuts confereixen l'aparença estriada del múscul esquelètic.

Les cadenes d'actina presenten llocs d'unió a miosina que es troben bloquejats per la tropomiosina, en repòs. A través de tota la longitud de la tropomiosina, es troben de manera dispersa complexos de troponina (formada per les subunitats troponina T, C i I). La troponina C té la capacitat d'unir ions de  $\text{Ca}^{2+}$  i en aquest estat provoca un canvi conformacional en la tropomiosina de manera que aquests llocs d'unió a miosina queden al descobert. A la banda Z hi ha ancorada la nebulina, una gran proteïna muscular que recórrer part del sarcòmer enrotllada al filament d'actina.

Els filaments gruixuts de miosina estan formats per molècules de miosina II i és una proteïna motora dependent d'ATP. Està formada per dues cadenes pesades idèntiques i dues parelles de dues cadenes lleugeres. La cadena pesada es diferencia en tres parts: el cap, el coll i la cua. La regió de la cua de les dues cadenes pesades s'enrotllen entre elles formant un dímer amb una estructura helical. Els caps presenten un lloc d'unió d'actina i un altre per ATP i, a més, formen un complex amb dues cadenes lleugeres. Paral·lelament als filaments gruixuts, la titina, la proteïna coneguda més gran, recórrer el sarcòmer des de la banda M fins la banda Z més propera. La funció de la titina està relacionada amb l'elasticitat de les fibres musculars, mantenint la longitud de repòs durant la relaxació del múscul.

### **2.1.2 Propagació del potencial d'acció**

La contracció muscular comença amb la despolarització de les fibres musculars. L'origen d'aquesta despolarització és degut a l'activació de neurones motores que alliberen el neurotransmissor acetilcolina a l'espai sinàptic. La sinapsi formada per un axó d'una neurona motora i una fibra muscular s'anomena unió neuromuscular. En la membrana plasmàtica de les cèl·lules musculars (també anomenat sarcolema) hi ha present una gran densitat de receptors nicotínics d'acetilcolina. Els receptors nicotínics d'acetilcolina són receptors ionotròpics i pertanyen a la família de canals iònics dependents de lligand, de manera que al unir-se l'acetilcolina al receptor, aquest actuarà com a canal de sodi provocant una entrada de  $\text{Na}^+$ . Això ocasionarà un canvi en el voltatge del sarcolema, el qual es trobava en repòs al voltant de  $-90\text{mV}$ . Aquesta despolarització local ocasiona la obertura de canals de  $\text{Na}^+$  dependents de voltatge

Na<sup>v</sup>1.4 (Jurkat-Rott, 2006), de manera que la despolarització es propaga pel sarcolema (Blijham et al, 2004) i cap a l'interior de les fibres a través de la xarxa de túbuls T (Nakajima i Gilai, 1980). Així s'aconsegueix que la despolarització arribi a tota la cèl·lula i es contregui tota la fibra alhora. Els túbuls T són unes invaginacions del sarcolema que recorren l'interior de les fibres musculars i contacten amb la regió de solapament entre les bandes A i I. Els túbuls T presenten una gran densitat de canals de calci dependents de voltatge tipus L coneguts amb el nom de receptors de dihidropiridina (DHPR, Rios i Brum, 1987). Aquests són capaços d'acoplar-se mecànicament als canals de calci, anomenats receptors de rianodina (RyR, Takeshima et al, 1994; Protasi et al, 1998) presents al reticle endoplasmàtic (anomenat reticle sarcoplàsmic) alliberant calci al citosol. L'extrem dels túbuls T es troba molt aprop de dues cisternes terminals del reticle sarcoplàsmic. Aquesta estructura anomenada tríada permet el contacte físic i funcional dels canals de calci per mitjà de canvis conformacionals dels RyR. El procés pel qual l'excitació elèctrica es tradueix en un increment en la concentració de calci intracel·lular es coneix com a acoplament excitació-contracció.

### **2.1.3 Repolarització de les fibres musculars**

Un cop finalitzada la contracció, el potencial de membrana ha de tornar al repòs. Per això, el calci alliberat torna a ser emmagatzemat al reticle sarcoplàsmic i s'obren canals de K<sup>+</sup>, majoritàriament K<sub>ir</sub>2.1, presents als túbuls T (Kristensen et al, 2006). La bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ajuda a recaptar el K<sup>+</sup> secretat per la repolarització i extreu l'excés de Na<sup>+</sup>. No obstant, l'espai entre els túbuls és molt limitat i l'alta concentració de K<sup>+</sup> acumulat genera una despolarització local. Les fibres musculars presenten una alta conductància pel Cl<sup>-</sup> i, gràcies a la obertura dels canals ClC-1 i la baixa concentració de Cl<sup>-</sup> intracel·lular, el Cl<sup>-</sup> difon passivament a favor de gradient electroquímic (Steinmeyer et al, 1991). D'aquesta manera s'aconsegueix evitar que la despolarització es propagui pel sarcolema i es mantingui l'activitat elèctrica de les fibres musculars. Una altra característica particular de les cèl·lules musculars, és que el Cl<sup>-</sup> (i no només el K<sup>+</sup> com en altres tipus cel·lulars) és el principal actor en mantenir el potencial de membrana de repòs (Steinmeyer et al, 1991).

### **2.1.4 ClC-1 i Miotonia congenita**

#### **2.1.4.1 Propietats biofísiques del canal ClC-1**

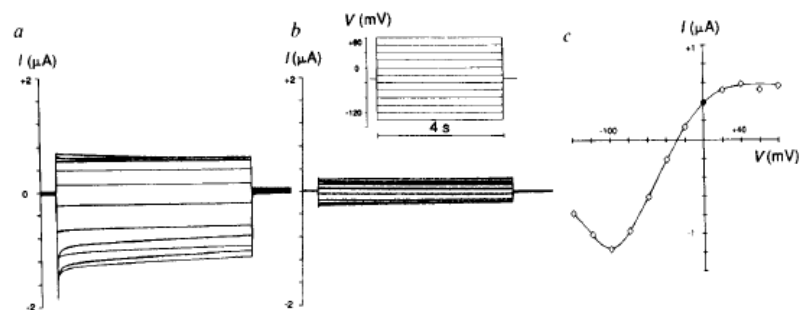
El canal de clorur ClC-1 va ser clonat l'any 1991 pel grup de Thomas Jentsch (Steinmeyer et al, 1991). Estudis electrofisiològics macroscòpics en múscul mostraven una alta conductància al clorur, suggerint la presència d'un canal de clorur (Bretag et



al, 1987). Així doncs, el grup de Jentsch va identificar una seqüència de DNA a partir de múscul esquelètic de rata que compartia homologia amb CIC-0 (Steinmeyer et al, 1991). Codificava per una proteïna encara més gran que la seva predecessora, comprèn 994 aminoàcids amb un pes de 110 kDa i comparteix un 54% d'identitat amb el canal de Cl<sup>-</sup> de *Torpedo*. La proteïna humana presenta 988 aminoàcids i un pes de 108 kDa. Estudis d'expressió de mRNA mostren una abundant expressió en teixit muscular i com aquesta incrementa, en rata, en les primeres setmanes de desenvolupament, paral·lelament amb un increment en la conductància al clorur (Conte-Camerino et al, 1989). Aquest increment de nivells de mRNA van acompanyats de l'increment d'altres canals iònics propis del múscul per mantenir les condicions fisiològiques (Cooperman et al, 1987; Trimmer et al, 1989; Mishina et al, 1986). També s'ha detectat expressió del canal en altres teixits com el fetge, el ronyó i més recentment en cèl·lules glials, tot i que nivells molt baixos. Al ser el primer canal CIC de mamífer identificat, se'l va anomenar CIC-1.

L'expressió del canal en oòcits de *Xenopus* mostra que el canal ja és actiu en les condicions de repòs del múscul esquelètic i les corrents incrementen cap a potencials més despolaritzants (Steinmeyer et al, 1991) (Figura 7). La conductància es manté linial entre el rang de -80mV i -20mV mentre que a potencials més hiperpolaritzants (<-80mV) s'observen unes corrents de gran amplitud que són inactivades ràpidament. Com més hiperpolaritzat sigui el pols, més evident serà la inactivació. També s'observa la seqüència típica de selectivitat aniònica dels CICs.

L'àcid 9-carboxílic antracè (9-AC) és un compost conegut per la seva capacitat d'inhibir canals de clorur (Furman i Barchi, 1978). L'aplicació d'aquesta droga en oòcits expressant CIC-1 a una concentració de 0.1mM veuen la activitat reduïda més d'un 80% (Steinmeyer et al, 1991) (Figura 7).



**Figura 7.** Expressió del canal CIC-1 en oòcits de *Xenopus*. **A** Traces típiques de CIC-1 en el medi salí ND96. S'observa activació del canal a potencials despolaritzats. **B** Registre del mateix oòcit després d'una incubació de 15 minuts amb 0.1mM de 9-AC. S'observa com l'administració de 9-AC inhibeix completament les corrents de CIC-1. **C** Relació I-V en medi ND96. Extret de Steinmeyer et al, 2001.

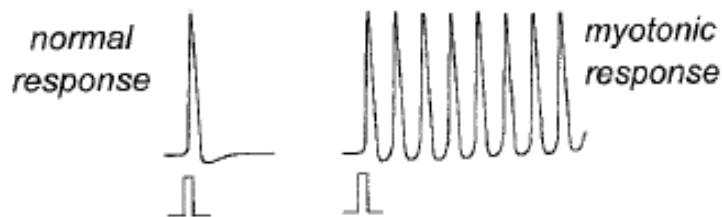
La obertura de CIC-1 no depèn només del voltatge, sinó que també de la concentració de  $\text{Cl}^-$  extracel·lular, de la concentració intracel·lular d'ATP i dinucleòtids adenina  $\beta$ -nicotinamida, ambdós unint-se als dominis CBS (Bennetts et al, 2007, Bennetts et al, 2012) i s'inactiva a pH àcid (Rychkov et al, 1996). L'ATP també té un paper important en el metabolisme muscular. A més, diversos laboratoris suggereixen que les corrents poden ser inhibides per l'activitat de la proteïna quinasa C (PKC) (Rosenbohm et al, 1999; Pierro et al, 2007).

Se sap que CIC-1 es degrada per l'acció del complex cullin 4 ubiquitina lligasa (Chen et al, 2015) però no quins elements en promouen la seva expressió. Recentment s'ha identificat una possible via biosintètica de CIC-1 formada per les xaperones FKBP8, Aha1 i HOP (Peng et al, 2016). Aquestes tres proteïnes, a més d'interaccionar amb el canal, en promouen l'expressió. L'aplicació de l'inhibidor de FKBP8 i Hsp90 $\beta$  17-AAG redueix els nivells de cullin 4, de manera que s'incrementa l'estabilitat de CIC-1, confirmant un paper regulador d'aquestes proteïnes en la degradació de CIC-1.

Com s'explica en l'apartat corresponent dels CICs, CIC-1 es troba present en la membrana plasmàtica de les cèl·lules musculars, però avui dia encara està en debat si la localització és exclusiva de sarcolema (Papponen et al, 2005; Lueck et al, 2010) o també es localitza en la membrana dels túbuls T (Dutka et al, 2008). Es pot provocar la destubularització de les fibres provocant un xoc osmòtic amb glicerol (Fraser et al, 1998). Hi ha grups que després de seguir aquest procediment observen com la conductància del  $\text{K}^+$  es manté però la del  $\text{Cl}^-$  disminueix. No obstant, els estudis d'immunohistologia realitzats només mostren presència de CIC-1 en sarcolema (Papponen et al, 2005).

La rellevància fisiològica del canal CIC-1 esdevé evident quan la seva pèrdua provoca que la membrana de les cèl·lules musculars es torna hiperexcitable ocasionant miotonia congènita, una patologia caracteritzada per rigidesa muscular (Bryant i Morales-Aguilera, 1971). L'aplicació de 9-AC (i altres compostos inhibidors de canals de clorur) en múscul i la incubació de fibres musculars en solucions sense clorur extracel·lular també provoquen miotonia, (Steinmeyer et al, 1991; Adrian i Bryant, 1974) reforçant d'aquesta manera la importància del clorur en el manteniment de l'excitabilitat muscular. De fet, experiments amb cabres miotòniques ja apuntaven a que la pèrdua de la conductància del clorur al sarcolema provoca miotonia (Adrian i Bryant, 1974) i anys més tard es va poder quantificar que aproximadament el 70% de la conductància total de les fibres musculars correspon al clorur (Palade i Barchi,

1977). Els pacients i animals afectats per aquesta malaltia presenten dificultats en la relaxació muscular després de la contracció voluntària. El retard en la relaxació es veu clarament reflectit en els electromiogrames on s'observa com un sol estímul despolaritzant genera potencials d'acció en sèrie, els anomenats “*myotonic runs*” (Figura 8). Curiosament, tot i que a través d'un mecanisme encara desconegut, es pot millorar la rigidesa muscular gràcies a l'efecte *warm up*. Aquest fenomen consisteix en la repetició del mateix moviment resultant en un alleujament de la rigidesa.



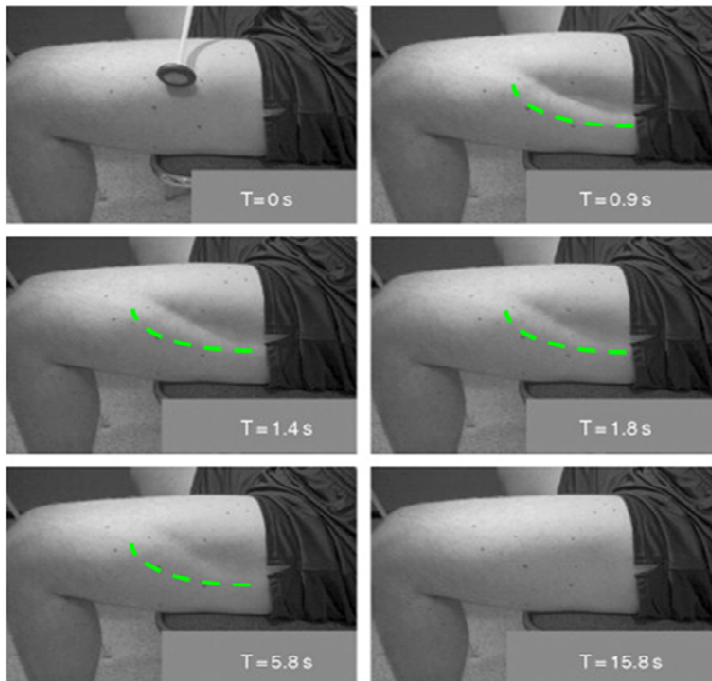
**Figura 8.** Resposta d'un múscul normal i d'un múscul miotònic a un sol estímul. S'observa com el múscul normal respon generant un sol potencial d'acció mentre que el múscul miotònic genera una sèrie de potencials d'acció (els anomenats *myotonic runs*). Extret de Berchtold et al, 2000.

Tot i que al voltant dels anys 70 ja se sabia que la conductància al clorur estava disminuïda en algunes formes de miotonia en cabres i humans (Bryant i Morales-Aguilera, 1971; Lipicky et al, 1971), no va ser fins al principi dels anys 90 que es va identificar CIC-1 com a causant d'aquesta patologia gràcies a la troballa que la inserció d'un transposó en el ratolí *adr* disruptia el gen *Cln1* (Steinmeyer et al, 1991). Aquest animal presenta debilitat muscular progressiva a partir dels 60 dies post natal. Els músculs presenten contraccions involuntàries durant uns segons després d'una contracció generada pel propi animal que a més coincideix amb els resultats d'electromiografia, on s'observa activitat elèctrica durant les contraccions involuntàries (Reininghaus et al, 1988). Posteriorment es van identificar mutacions en el gen *CLCN1* en pacients amb miotonia i més endavant en altres espècies animals com cabres, cabres i gossos (Koch et al, 1992; Beck et al, 1996; Rhodes et al, 1999).

A més de la miotonia congènita, es pensa que formes aberrants d'splicing en CIC-1 podrien ser causants d'aquesta símptoma en altres malalties, com la distròfia miotònica (Charlet et al, 2002; Mankodi et al, 2002) o inclòs Huntington (Waters et al, 2013). Més recentment també s'ha suggerit que certs polimorfismes del canal estarien implicats en epilèpsia (Chen et al, 2013). No obstant, aquest últim punt s'hauria d'estudiar amb més detall per dos motius, el primer és que l'expressió de CIC-1 en cervell és mínima i segon perquè la pèrdua de funció d'aquesta proteïna ocasiona miotonia i no epilèpsia.

### 2.1.4.2 Miotonia congènita

La miotonia congènita és una malaltia genètica tant amb herència dominant (coneguda com a malaltia de Thomsen, MIM #160800) com recessiva (coneguda com a malaltia de Becker, MIM #255700), sent aquesta última molt més severa. Els afectats per aquest trastorn presenten rigidesa i hipertròfia muscular i contracció mantinguda, és a dir, pateixen un retard en la relaxació muscular (Figura 9) (Bryant i Morales-Aguilera, 1971).



**Figura 9.** Contracció perllongada en un pacient amb miotonia. L'ús d'un martell de reflexes en l'extrem distal del múscul vast lateral provoca la contracció de tot el múscul que es manté durant segons. Extret de Lossin i George, 2008.

Hi ha dues variants classificades segons si el patró hereditari és dominant o recessiu. La primera descripció mèdica de la miotonia congènita data del 1876, quan Julius Thomsen va publicar un article sobre un trastorn muscular que afectava a diversos membres de la seva família i a ell mateix (Thomsen, 1876). Per això també es coneix a la variant dominant com a malaltia de Thomsen. La miotonia resulta evident ja en la infància temprana (Becker, 1977) sent el primer símptoma el retard de la relaxació de les perpelles després de tancar i forçar els ulls (Wakeman et al, 2008). Els infants presenten uns músculs molt definits, fet impropï en aquestes edats, tot i que no arriben a mostrar hipertròfia. No obstant, el diagnòstic és més freqüent més tard en la infància, ja que els nens presenten moviments maldestres i dificultat de moviment després de moments de repòs. Els músculs de les cames es troben especialment més rígids.

La forma dominant o de Thomsen sol ser lleu, sent els casos severos molt infreqüents. L'esperança de vida dels afectats és completament normal i no hi ha progressió dels símptomes, de manera que "aprenen" a conviure amb aquesta condició. No obstant,

tants en els casos més severos com en la forma recessiva hi ha elevat risc de caiguda degut a la dificultat de mantenir-se d'empes quan perden l'equilibri (Freeble i Rini, 1949).

L'edat d'inici de la simptomatologia, els músculs afectats i la severitat poden divergir entre pares, fill i germans (Colding-Jorgensen, 2005). S'ha donat el cas d'individus portadors de mutacions patològiques que són clínicament asimptomàtics. Curiosament, quan es sotmeten a un electromiograma sí s'observen alteracions elèctriques lleus. Aquest fenomen es coneix com a miotonia latent.

La forma recessiva rep el nom de malaltia de Becker en honor a Peter Emil Becker, qui va dedicar gran part de la seva vida evaluant pacients amb miotonia congènita (Becker, 1966). La simptomatologia apareix en la infància amb miotonia generalitzada i a diferència de la forma dominant, els infants sí presenten hipertròfia muscular deguda a un increment crònic d'activitat muscular. A més, presenten una miotonia més severa acompanyada de períodes de debilitat muscular al moment d'iniciar un moviment (Rüdel et al, 1988). Això pot comprometre la salut dels pacients perquè aquesta debilitat pot aparèixer en els músculs responsables del manteniment postural i poden caure descontroladament. No és molt freqüent però alguns pacients poden presentar atròfia en els avantbraços i dolor en forma de rampes (Becker, 1977).

Una mutació amb efecte dominant negatiu, al formar un dímer amb una subunitat WT aboliria la funció del dímer resultant. No obstant, també hi hauria dímers formats per dues subunitats WT de manera que un pacient heterozigot encara presentaria un 25% d'activitat CIC-1. En canvi, la forma recessiva comporta la pèrdua total de les corrents CIC-1. Les mutacions amb efecte dominant negatiu poden provocar alteracions en el tràfic intracel·lular, degradació de l'heterodímer o inclòs canviar-ne les propietats biofísiques com el desplaçament en el voltatge d'obertura cap a potencials positius no fisiològics (Pusch et al, 1995; Rhodes et al, 1999; Wu et al, 2002). Això resulta en una alteració del *common gate* implicant que els canals restaran tancats en potencials fisiològics sent incapaços de repolaritzar el potencial d'acció o de mantenir el voltage de repòs. Són interessants les mutacions G230E, que modifica la permeabilitat i selectivitat iònica (Fahlke et al, 1997), D136G, la primera mutació patogènica estudiada funcionalment que canvia la dependència d'obertura per la concentració intracel·lular de Cl<sup>-</sup> invertint la dependència de voltatge de CIC-1 (Fahlke et al, 1995) i T550M, que modifica la dependència de voltatge dels dos mecanismes d'obertura, fent que un continuï sent dependent de despolarització mentre que l'altre ho sigui per

hiperpolarització (Wu et al, 2002). Gràcies als cristalls obtinguts de proteïnes CIC s'han pogut mapar les mutacions identificades. És curiós veure com la majoria es troben molt properes a regions tant importants com la interfície entre les dues subunitats, la regió extracel·lular que connecta les hèlix K i M i els dominis CBS (Park et al, 2017). No obstant, no totes les mutacions presenten aquest patró tan clar d'afectació. Hi ha mutacions que presenten una menor penetrància i s'han donat casos en què una mateixa mutació que es troba en famílies independents, en unes presenta un patró d'herència dominant mentre que en altres recessiu (Koty et al, 1996; Kubisch et al, 1998; Plassart-Schiess et al, 1998). Tot i que diverses d'aquestes mutacions s'han demostrat com a dominants negatius experimentalment, aquest fet obre la porta a la possibilitat d'altres gens implicats o que almenys hi hagi factors genètics que agreugin el comportament dels mutants a nivell funcional o d'expressió (Duno et al, 2004).

#### **2.1.4.3 Farmacologia de CIC-1 i possibles teràpies**

Molts pacients de miotonia no requereixen de medicació, simplement minimitzen els símptomes evitant possibles situacions que podrien induir la miotonia. No obstant, en alguns casos això no és suficient i es requereix d'un suport farmacològic. En els primers tractaments s'administrava quinidina i quinina, dos fàrmacs prèviament utilitzats per tractar arrítmies i malària (Brodsky et al, 1996; Brossi et al, 1971). Malauradament, l'exposició continuada d'aquests fàrmacs resultaven ser tòxics, manifestant-se en pèrdua visual i auditiva, vertígen i problemes gastrointestinals. A més, una exposició a llarg termini pot generar ototoxicitat (Brown i Feldman, 1978), desenvolocar en trastorns neurològics (Gilbert, 1978; Johnson et al, 1990) i ocasionar la mort (Thomson, 1956).

Una altra estratègia que es va seguir posteriorment és l'administració de bloquejants de canals de sodi dependents de voltatge, com la procaïna (Munsat, 1967), tocainida (Catalano et al, 2008), mexiletine (Ricker et al, 1994), carbamazepina (Savitha et al, 2006) i fenitoina (Aichele et al, 1985). No obstant, apart de reduir la miotonia, també s'ha observat pèrdua de força muscular. Però el punt més important és l'aparició d'efectes secundaris que podrien ser greus en individus d'edat avançada o amb problemes cardíacs. Els compostos lacosamida, lamotrigina i rufinamida són 3 moduladors de canals de sodi utilitzats com a anticonvulsants. En fibres musculars aïllades humanes i de rata, tots 3 han estat capaços d'eliminar el comportament miotònic, observant-se un efecte sinèrgic amb la combinació de lamotrigina i rufinamida (Skov et al, 2016).

L'aproximació potser més directe i eficaç seria la d'incrementar l'activitat de CIC-1, no obstant, es desconeixen activadors que siguin suficientment potents per contrarestar la miotonia. Se sap que la taurina i l'isòmer R-(+) de l'àcid clofibrí presenten la capacitat d'incrementar les corrents del canal, no obstant, aquest efecte només és moderat i insuficient per prevenir la miotonia (Conte-Camerino et al, 1984). En canvi, l'aplicació de taurina en oòcits sobreexpressant CIC-1 veuen incrementades les corrents un 100% i es desplaça la dependència de voltatge cap a potencials més negatius (Conte-Camerino et al, 2004). No obstant, aquest fenomen requereix de canals total o parcialment funcionals, de manera que la seva aplicació com a agent terapèutic és qüestionable en els casos en què la mutació alteri l'expressió del canal i els nivells de proteïna.

A més del 9-AC esmentat anteriorment, un altre compost que pertany a la mateixa família, l'herbicida àcid 2, 4-diclorfenoxiacètic (2, 4-D) (Bradberry et al, 2000) és capaç de disminuir la conductància de clorur alterant la selectivitat iònica de CIC-1. Aquest fàrmac redueix els nivells de colesterol clofibrat (Conte-Camerino et al, 1984), però també actua sobre CIC-1 accelerant la desactivació del canal i desplaçant la dependència de voltatge cap a potencials més despolaritzats (Pusch et al, 2000). Les estatines s'utilitzen per reduir els nivells de colesterol en sang. No obstant, s'ha descrit que el tractament amb simvastatina i pravastatina en conills induïx miotonia reduïnt la conductància del clorur en el sarcolema (Pierno et al, 1995; Sonoda et al, 1994). Es va observar el mateix efecte en rates administrant fluvastatina i atorvastatina (Pierno et al, 2006).

No només la farmacologia de les proteïnes CIC és encara desconeguda sinó que també els llocs d'unió d'aquests compostos o si actuen des de l'espai extracel·lular o intracel·lular. Arribar a descobrir aquests punts ajudarien a aprofundir en l'estudi estructura-funció d'aquestes proteïnes. L'estructura primària entre els CICs és molt similar, de manera que petites variacions confereixen propietats úniques com la sensibilitat a un inhibidor. El 9-AC és capaç d'inhibir eficaçment les corrents de CIC-1 però d'una manera molt feble les corrents de CIC-0 (Steinmeyer et al, 1991), CIC-2 (Clark et al, 1998) i CIC-5 (Steinmeyer et al, 1995). Utilitzant precisament aquesta estratègia i gràcies a l'estructura de Dutzler et al, es va identificar una serina 537 (posició de CIC-1) essencial per l'alta sensibilitat de CIC-1 pel 9-AC (Estévez et al, 2003). En aquest treball també demostren que el 9-AC bloqueja el canal accedint des de l'interior de la cèl·lula i que altres residus importants per la inhibició per 9-AC es troben en una regió altament hidrofòbica propera al lloc d'unió intern de clorur.

## 2.2 Fisiologia de les cèl·lules glials

La majoria de tipus de neurones presenten l'axó recobert per la veina de mielina formada per les cèl·lules glials oligodendròcits i les cèl·lules de Schwann, en el sistema nerviós central i en el sistema nerviós perifèric, respectivament. En ambdós casos, el recobriment és intermitent de manera que presenta una regió coberta de mielina seguida d'una regió descoberta. La regió recoberta es troba completament aïllada elèctricament de l'espai extracel·lular. D'altra banda, la regió sense mielina (que es coneix com a nodes de Ranvier) presenta una alta densitat de canals iònics de  $\text{Na}^+$  essencials per la propagació del potencial d'acció des del soma fins al terminal sinàptic. Una neurona pot ser despolaritzada per diferents estímuls i, si aconsegueixen sobrepassar un voltatge llindar, acabaran originant un potencial d'acció. El potencial d'acció generat per la despolarització en el soma obrirà els canals de  $\text{Na}^+$  del node de Ranvier més proper i es produirà una despolarització local. Seguidament aquests canals de sodi s'inactivaran i la sortida de  $\text{K}^+$  a través de canals de  $\text{K}^+$  presents al juxtapanode repolaritzarà la membrana. Mentrestant s'obriran els canals de  $\text{Na}^+$  del següent node de Ranvier. Aquest tipus de conducció elèctrica d'un node de Ranvier a un altre es coneix amb el nom de conducció saltatòria i només és possible gràcies a la beina de mielina. Un altre avantatge dels axons mielinitzats és que la propagació del potencial d'acció es dona més eficient i ràpidament.

La regulació del  $\text{K}^+$  extracel·lular és vital pel correcte funcionament neuronal. El cervell només està preparat per resistir concentracions de  $\text{K}^+$  d'entre 2-3 mM, però en algunes situacions pot augmentar fins a 10-12 mM, com després de l'estimulació elèctrica o fins a 80 mM en condicions patològiques (Moghaddam and Adams, 1987). Existeixen dos mecanismes de tamponament del  $\text{K}^+$  extracel·lular, ja sigui reabsorbint ions  $\text{K}^+$  o el transport de  $\text{K}^+$  cap al torrent sanguini (Kofuji i Newman, 2004). Aquest últim es coneix com a sifoneig de potassi.

### 2.2.1 Sifoneig de $\text{K}^+$

El sifoneig de  $\text{K}^+$  depèn de l'alta permeabilitat dels astròcits al  $\text{K}^+$ . S'ha demostrat que els peus astrocitaris en presenten una alta conductància i s'han registrat grans fluxos de  $\text{K}^+$  en aquesta regió després d'activitat neuronal (Newman et al., 1984; Orkand et al., 1966). El  $\text{K}^+$  és captat per diversos canals als peus astrocitaris, es transporta a través de la xarxa d'astròcits i, finalment, s'allibera al torrent sanguini acompanyat del moviment d'aigua osmòtica (Rash, 2010).



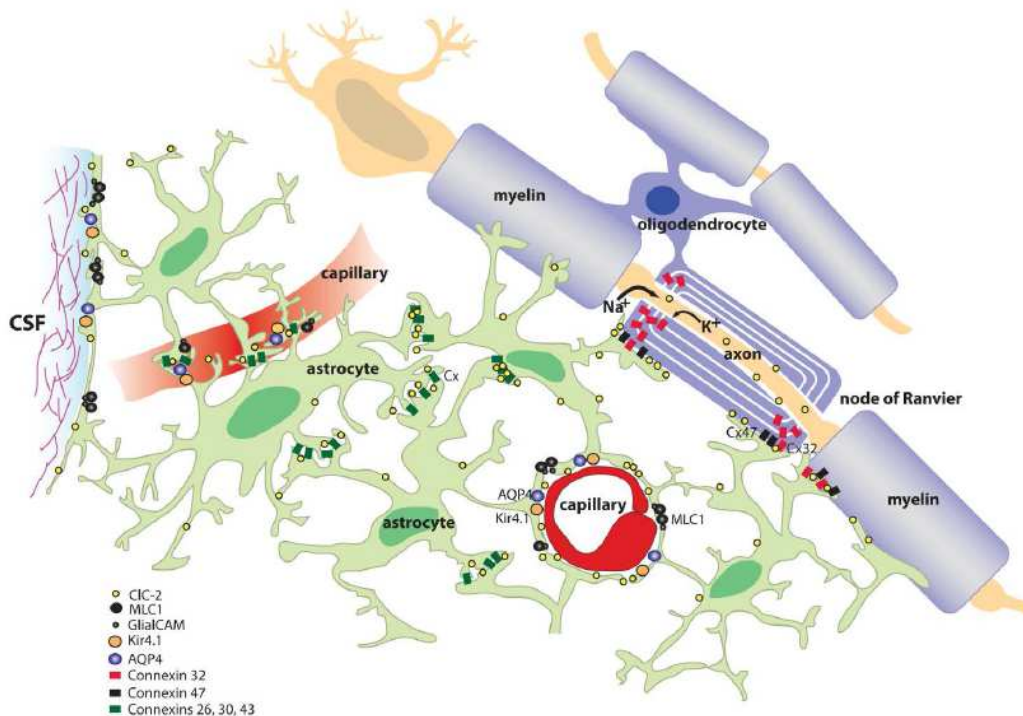
S'han descrit diferents canals de  $K^+$  que s'expressen en astròcits. Entre ells destaca el canal  $K_{ir}$  4.1 ja que s'ha demostrat que a través d'aquest canal es detecta la majoria de la conductància dels astròcits (Butt i Kalsi, 2006; Olsen et al, 2006). A més, també s'expressa en oligodendròcits, en la glia de Bergmann i en la glia de Müller permetent un moviment bidireccional de  $K^+$  en funció del seu gradient transmembrana (Kalsi et al., 2004). Així, els astròcits transfereixen el  $K^+$  des de les regions on s'acumula als llocs amb una menor concentració per finalment desembocar als vasos sanguinis. Aquest procés es porta a terme mitjançant un flux de corrent a través de la xarxa glial, el qual pot ser reversible.

El canal  $K_{ir}$  4.1 colocalitza en els peus astrocitaris amb la sintrofina, una proteïna associada al complex glicoproteic associat a distrofina (DGC) (Benfenati i Ferroni, 2010) i amb l'aquaporina AQP4. Prèviament, s'havia suggerit que AQP4 podria estar facilitant el moviment d'aigua a través de la membrana cooperant amb  $K_{ir}$  4.1 amb el moviment de  $K^+$  (Nagelhus et al, 2004). A més, també s'ha suggerit que AQP4 estaria regulant la dinàmica del volum de l'espai extracel·lular en el cervell (Haj-Yasein et al., 2012). L'AQP4 també colocalitza amb altres proteïnes formadores del DGC. L'anclatge entre l'AQP4 i la sintrofina sembla ser clau perquè l'AQP4 pugui portar a terme la seva funció, ja que el ratolí *knock-out* de sintrofina mostra pèrdua de la proteïna AQP4 en la membrana perivascular dels peus astrocitaris i els animals mostren un retard en el tamponament de  $K^+$  extracel·lular, fet que provoca una activitat neuronal sostinguda (Amiry-Moghaddam et al, 2003; Dmytrenko et al, 2013; Neely et al, 2001). Aquest animal deficient en sintrofina mostra la proteïna  $K_{ir}$  4.1 i les seves propietats funcionals inalterades, de la mateixa manera que ho fa el *knock-out* d'AQP4. Aquests resultats implicarien que  $K_{ir}$  4.1 i AQP4 no presenten una interacció funcional com es pensava (Zhang and Verkman, 2008). Una possible explicació per aquest fet podria ser que aquestes dues proteïnes no pertanyen al mateix microdomini de la membrana plasmàtica. Ja que els astròcits poden ser considerats com una unitat multifuncional, s'ha hipotetitzat que  $K_{ir}$  4.1 podria presentar diferents funcions segons la regió on s'expressi. D'aquesta manera podria realitzar una funció específica quan es localitza en els peus astrocitaris rodejant els vasos sanguinis i una altra quan es localitza prop de les sinapsis (Benfenati and Ferroni, 2010). Un treball recent mostra que  $K_{ir}$  4.1 no presenta un paper predominant en l'absorció de  $K^+$ , tot i que sí és essencial per un tamponament eficient d'aquest (Chever et al, 2010).

També són importants les unions de tipus *gap* que permeten el transport d'ions entre cèl·lules adjacents. Els astròcits expressen principalment la Cx43, però també

expressen Cx30 i Cx26 (Nagy et al, 2004). S'ha descrits diverses relacions funcionals entre aquestes proteïnes *gap* amb AQP4 i Kir4.1 (Ribeiro et al, 2006; Nicchia et al, 2005; Menichella et al, 2006).

Recentment també s'han incorporat la participació del canal de clorur CIC-2 i les proteïnes MLC1 i GlialCAM en aquest procés tan complex (Figura 10). S'ha observat que els animals *knock out* per aquestes proteïnes presenten edema intramielínic, suggerint defectes en l'homeòstasi iònica en el cervell (Depienne et al, 2013; Hoegg-Boiler et al, 2014) tot i que els fenotips vacuolitzants difereixen del de l'animal deficient per Kir 4.1 (Chever et al, 2010). Gràcies a la càrrega negativa del Cl<sup>-</sup> s'aconsegueix un transport electroneutre.



**Figura 10.** Flux de K<sup>+</sup> després del potencial d'acció. Quan la neurona es despolaritza entra Na<sup>+</sup> pels nodes de Ranvier. La sortida compensatòria de K<sup>+</sup> es dona al paranode. El K<sup>+</sup> i l'aigua atravesen les capes de mielina i arriben a la xarxa glial a través de les unions *gap* Cx32 i Cx47. Extret de Depienne et al, 2013.

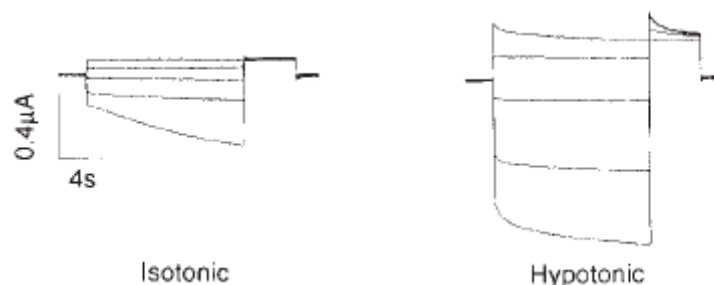
## 2.2.2 CIC-2 i leucodistròfia

### 2.2.2.1 Propietats biofísiques del canal CIC-2

El canal de Cl<sup>-</sup> CIC-2 consta de 907 aminoàcids i té un pes molecular de 99 kDa. És codificat pel gen *CLCN2* i s'expressa ubíquament, presentant una alta expressió en l'intestí, estómac, glàndules salivars, cor, ronyó i cervell (Gründer et al, 1992; Thiemann et al, 1992). Es suggereix que CIC-2 podria desenvolupar diferents funcions segons l'òrgan en el que s'expressi. En el cervell, CIC-2 s'expressa en neurones, oligodendròcits i astròcits (Blanz et al, 2007; Jeworutzki et al, 2012; Sík et al, 2000).

S'hipotetitza que hi ha una baixa conductància al  $\text{Cl}^-$  en estat de repòs en els astròcits mentre que els oligodendròcits en presenten una alta permeabilitat (Kimmelberg et al, 2006; Walz, 2002). A nivell cel·lular, CIC-2 es localitza a les membranes basolaterals de les cèl·lules polaritzades *in vitro* i *in vivo*. Tot i així, una gran proporció del canal es detecta intracel·lularment. S'ha suggerit que quan aquest es troba de manera intracel·lular podria estar associat a estructures intracel·lulars membranoses, en canvi, quan es troba en la membrana cel·lular apareix en forma d'agregats i possiblement associat a *lipid rafts* (Cornejo et al, 2009).

Aquest canal es troba tancat en condicions de repòs i s'activa lentament per hiperpolarització de la membrana (-40 a -140 mV) (Figura 11) relativa a l'equilibri de potencial del  $\text{Cl}^-$  (-30 mV). A diferència de CIC-1, s'activa per acidificació moderada (Niemeyer et al., 2009). D'altra banda, un medi alcalí disminueix les corrents de CIC-2 en sistemes d'expressió heteròloga com els oòcits de *Xenopus* (Jordt i Jentsch, 1997) i endògena en cèl·lules de mamífer (Clark et al, 1998). L'activació màxima del canal es dona a un pH proper a 6.5 i s'inhibeix amb una acidificació més potent (Arreola et al., 2002; Jordt and Jentsch, 1997). A més, s'inhibeix irreversiblement a pH superiors a 9. Aquesta complexa modulació de CIC-2 del pH extracel·lular es podria explicar per l'existència de dos llocs d'unió a  $\text{H}^+$  independents que modulen la seva activitat desplaçant la dependència de voltatge (Arreola et al, 2002). Les corrents de CIC-2 s'incrementen degut a l'augment del volum cel·lular induït per hipotonicitat quan s'expressa en oòcits de *Xenopus* (Figura 11) (Gründer et al, 1992, Thiemann et al., 1992), suggerint que el canal podria estar implicat en mecanismes de regulació del volum cel·lular (Jordt and Jentsch, 1997). Sota condicions hipotòniques, l'inflament cel·lular accelera l'activació del canal i augmenta l'amplitud de les corrents regulades per CIC-2 mentre que el desinflatament cel·lular en condicions hipertòniques inhibeix les corrents (Duan et al, 2000; Gründer et al, 1992; Hume et al, 2000).



**Figura 11.** Expressió del canal CIC-2 en oòcits de *Xenopus*. A l'esquerre s'observen les traces típiques de CIC-2 en un medi isotònic. A la dreta s'observa un increment en l'amplitud de les corrents en un medi hipotònic. Extret de Gründer et al, 1992.

Experiments de mutagènesi han aportat informació sobre les regions responsables del mecanisme d'obertura de CIC-2. Mutacions en l'extrem N-terminal de CIC-2 resulten en canals constitutivament oberts, amb una relació corrent-voltatge gairebé lineal, fent-los insensibles a canvis de pH i osmolaritat extracel·lulars. Aquests resultats indiquen que els dominis necessaris per l'activació depenent de voltatge, augments de volum i pH es situen en aquest extrem i s'han descrit com dominis essencials (Jordt and Jentsch, 1997). En canvi, delecions en la regió C-terminal de CIC-2 provoquen que el canal estigui parcialment obert i que mantingui la seva resposta tant a canvis de voltatge com a canvis osmòtics (Gründer et al, 1992). De la mateixa manera que els seus homòlegs CIC-0 i CIC-1, presenta la mateixa seqüència de permeabilitat aniónica  $\text{Cl}^- \gg \text{Br}^- > \text{I}^- \gg \text{F}^-$  (Stölting et al., 2013; Thiemann et al. 1992).

### 2.2.2.2 Farmacologia i regulació de l'activitat de CIC-2

S'ha descrit que CIC-2 es bloqueja per derivats de l'àcid carboxílic (com per exemple, DPC, NPPB i  $\text{Cd}^{2+}$ ) però és insensible a tamoxifen (TMX) i SITS (Duan et al., 2000; Furukawa et al., 1998). A part d'aquests compostos, la toxina GaTx2 (pèptid derivat del verí de l'escorpi *Leiurus quinquestriatus hebraeus*) inhibeix amb alta afinitat CIC-2 enlentint la seva activació però no bloqueja els canals que ja es troben oberts. És important destacar que GaTx2 no afecta cap dels altres canals de  $\text{Cl}^-$  i és considerat un inhibidor específic per CIC-2 (Thompson et al, 2005; Thompson et al, 2009). D'altra banda, també s'han identificat agents farmacològics amb la capacitat d'activar el canal com l'omeprazol, la modificació covalent d'amidació (Cuppoletti et al, 2001) i l'àcid araquidònic (Tewari et al, 2000).

Actualment hi ha poques evidències sobre la regulació de CIC-2 per fosforilació quan s'expressa el canal de manera heteròloga. S'ha descrit que aquest canal no s'activa per fosforilació depenent d'AMPc en oòcits de *Xenopus* (Furukawa et al, 1998), tot i que en alguns treballs es mostra que les corrents endògenes podrien estar modulades per fosforilació (Fritsch i Edelman, 1996) suggerint que aquest mecanisme de regulació pot requerir proteïnes associades. Efectivament, en presència de PKA intracel·lular, es dona una activació de CIC-2 i que pot ser suprimida per inhibidors de PKA, mPKI i H-89 (Kajita et al, 2000; Tewari et al, 2000). A més, experiments de mutagènesi dirigida han permès determinar dos llocs responsables de l'activació de PKA situats a l'extrem C-terminal del canal CIC-2 en humans (Cuppoletti et al, 2004). Factors que alteren els nivells d'expressió de CIC-2 també podrien estar regulant la seva activació. Diferents treballs han descrit augments en l'expressió de CIC-2 al ronyó

per l'acció d'hormones que modulen la reabsorció renal com l'aldosterona (Ornellas et al, 2002) i la vasopressina (Morales et al, 2001), suggerint un rol del canal en el transport de Cl<sup>-</sup>. Els nivells de CIC-2, tant a nivell de mRNA com de proteïna, es troben significativament reduïts en ronyó de rata quan es realitza una ovariectomia, i aquests nivells es restableixen per l'acció d'estrògens com l'estradiol (Nascimento et al, 2003).

Les proteïnes Hsp90 i Hsp70 s'activen en resposta a estrès cel·lular i es troben associades a CIC-2. Aquesta interacció resulta en una sobreactivació del canal incrementant la probabilitat d'obertura i la sensibilitat a Cl<sup>-</sup> intracel·lular (Hinzpeter et al, 2006). D'altra banda, la inhibició de Hsp90 comporta una menor arribada de CIC-2 a la membrana plasmàtica i, per tant, a una reducció de l'amplitud de les corrents generades per CIC-2.

Interessantment, determinats compostos com el TNF- $\alpha$  (Bali et al, 2001) o l'àcid araquidònic (Cuppoletti et al., 2001) poden modular l'activitat de CIC-2 en cèl·lules epitelials de còlon o de pulmó, respectivament. L'activació de CIC-2 per l'àcid araquidònic no s'inhibeix pels inhibidors de PKA.

Finalment, CIC-2 podria regular-se per alteracions en el citoesquelet degut a l'existència d'interaccions electrostàtiques entre l'extrem N-terminal del canal i el citoesquelet d'actina (Ahmed et al, 2000).

Diferents estudis han suggerit que el tràfic endosomal i el reciclatge de CIC-2 està parcialment regulat per vies depenents de rab5 i rab11 (Cornejo et al, 2009; Dhani et al, 2008). Tanmateix, s'ha observat que CIC-2 és objecte d'una ràpida endocitosi, fent que aproximadament un 70% de la proteïna sigui reciclada passats 4-8 minuts d'internalització. Aquesta internalització per endocitosi és regulada en part per la tirosina 179 present en un *loop* intracel·lular. Així doncs, només una petita proporció resideix en els *lipid rafts* (Cornejo et al, 2009).

Recentment, s'ha descrit que la quinasa JAK2, activada per l'encongiment de la cèl·lula, disminueix l'activitat de CIC-2 en oòcits de *Xenopus* interferint en la seva inserció en la membrana (Hosseinzadeh et al., 2012). S'ha suggerit també que tant l'estrès metabòlic, com la depleció d'ATP, indueixen un increment de l'expressió de CIC-2 en la superfície cel·lular degut a una reducció en la internalització per endocitosi (Dhani et al, 2008), donant-se la interacció entre CIC-2 i ATP per mitjà dels dominis CBS de CIC-2 (Stölting et al, 2013).

### 2.2.2.3 Funcions fisiològiques de CIC-2 i patologies associades

Encara no s'han pogut descriure completament totes les funcions que CIC-2 porta a terme i, a més, aquestes podrien ser diferents segons el tipus cel·lular on s'expressa. Els diferents rols fisiològics del canal coneguts s'han pogut definir gràcies al ratolí *knock-out* per *CLCN2* (Bösl et al, 2001; Cortez et al, 2010; Makara et al, 2003; Nehrke et al, 2002; Nighot et al, 2009; Zúñiga et al, 2004) i per pacients amb mutacions en *CLCN2* (Di Bella et al., 2014; Depienne et al., 2013). Els primers estudis van mostrar que l'absència de la proteïna CIC-2 provoca la degeneració de les cèl·lules germinals masculines, resultant en infertilitat, i dels fotoreceptors en el ratolí *knock-out* (Bösl et al, 2001). Amdós teixits presenten una barrera encarregada de mantenir un entorn iònic estable, els túbuls seminífers i la retina. La manca de CIC-2 provoca la mort d'unes cèl·lules que formen part d'aquesta barrera, suggerint un paper regulador en el transport transepitelial per CIC-2 (Bösl et al, 2001). Fins al moment s'han descrit pocs pacients amb mutacions en *CLCN2*, alguns dels quals presenten corioretinopatia amb defectes en el camp de visió (Depienne et al, 2013) i recentment s'ha identificat un pacient que mostra també infertilitat (Di Bella et al, 2014). Tot i així, el paper fisiològic de CIC-2 en la retina i els testicles continua sent desconegut i tant sols s'ha suggerit que CIC-2 podria ser important pel control iònic de l'entorn cel·lular en aquests teixits.

El transport transepitelial de  $\text{Cl}^-$  també és important per la producció de saliva. S'han identificat unes corrents amb propietats biofísiques reminiscents de CIC-2 (Komwatana et al, 1994) i estudis d'immunohistoquímica han confirmat l'expressió de CIC-2 en les glàndules salivals (Romanenko et al, 2008). Aquestes corrents es perden en animals *Clcn2<sup>-/-</sup>* (Nehrke et al, 2002). No obstant, no presenten canvis ni en la composició iònica, ni la osmolaritat ni la freqüència de secreció de saliva (Romanenko et al, 2008). Aquest fet suggereix que CIC-2 no és imprescindible per la reabsorció iònica en les glàndules salivals.

L'epitel·li intestinal regula el transport d'aigua, d'ions i de nutrients a més de formar una barrera contra toxines i organismes patogènics. S'ha suggerit que CIC-2 pot tenir un paper en el manteniment i reparació d'aquesta barrera després d'una isquèmia (Moeser et al, 2004; Nighot i Bliklager, 2012). L'absència de CIC-2 durant la formació de la monocapa comporta una localització subapical difosa d'Occludina, mentre que l'aplicació de l'activador de CIC-2 lubiprostona recupera la localització d'Occludina en la mucosa afectada per isquèmia (Moeser et al, 2007). A més, Catalán et al identifiquen CIC-2 com a component essencial pel transport electroneutre de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  i

Cl<sup>-</sup>, el qual es veu dràsticament reduït en els animals deficients per CIC-2 (Catalán et al, 2012).

A més, regula el potencial de membrana de repòs i l'activitat marcapassos del cor (Boyett et al, 2000). Quan el potencial de membrana és més negatiu que el potencial d'equilibri del clorur, CIC-2 genera un flux de sortida de Cl<sup>-</sup> (Duan et al, 1997; Duan et al, 2000). Estudis amb ratolins *Clcn2*<sup>-/-</sup> sota condicions d'estrés degut a exercici presenten una freqüència cardíaca significativament inferior a animals WT (Huang et al, 2009).

També s'ha observat que CIC-2 és capaç de regular la proliferació cel·lular, tant en cèl·lules de múscul llis vascular com en gliomes (Cheng et al, 2007; Yang et al, 2006). IGF-1 promou la proliferació de les cèl·lules de múscul llis vasculars i la seva acció és inhibida per bloquejants de canals de clorur, incrementant a més els nivells de mRNA i proteïna de CIC-2. A més, l'ús de siRNA contra CIC-2 aboleix la proliferació mediada per IGF-1 (Cheng et al, 2007) i redueix la taxa de creixement en línies de gliomes malignes, suprimint la formació de noves colònies (Yang et al, 2006).

S'ha hipotetitzat que una altra funció de CIC-2 seria la de proporcionar una via alternativa per la secreció epitelial de Cl<sup>-</sup> en paral·lel amb el canal CFTR, de manera que activant els canals CIC-2 endògens es podria augmentar la conductància de Cl<sup>-</sup> en pacients de fibrosi quística (Schwiebert et al, 1998). Es caracteritza per un transport anòmal de Cl<sup>-</sup> i Na<sup>+</sup> a través de l'epiteli provocant secrecions viscoses i espesses causades per mutacions en el canal de Cl<sup>-</sup> CFTR (Yankaskas et al, 2004). Estudis realitzats en el ratolí doble *knock-out* per CIC-2 i CFTR mostren que la manca de CIC-2 no provoca una major afectació respecte el ratolí *knock-out* per CFTR ni disminueixen els nivells de secreció de Cl<sup>-</sup> (Zdebik et al., 2004).

També s'ha suggerit que CIC-2 pot tenir un paper clau en la regulació del volum degut a la seva activació en condicions hipotòniques, les quals es donen quan una cèl·lula incrementa el seu volum. En cardiomiòcits, se sap de la participació de canals de clorur pel manteniment del volum cel·lular (Duan et al, 1997). No obstant, encara no es coneix la seva identitat. En el cervell regulen diferents processos com el volum cel·lular, el transport transepitelial i la concentració intracel·lular de Cl<sup>-</sup> en neurones que expressen els receptors inhibitoris de GABA (Jentsch et al, 1999; Smith et al, 1995; Zúñiga et al, 2004).

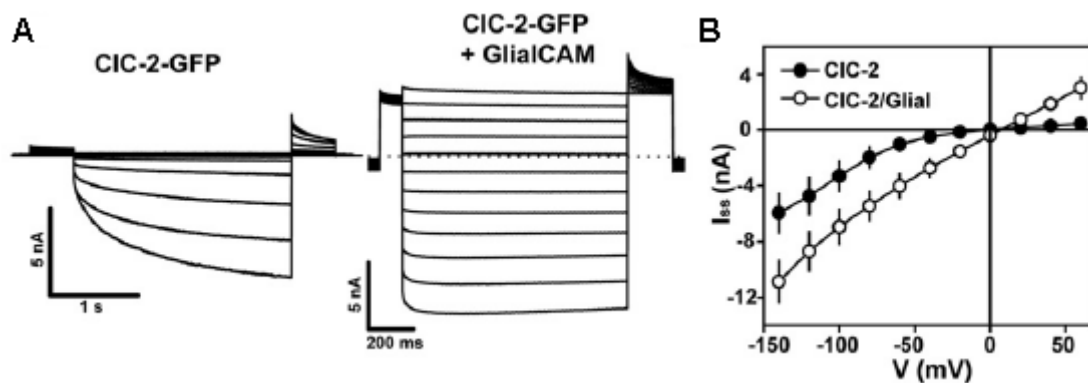
CIC-2 s'expressa en neurones hipocampals piramidals, en algunes interneurons (Smith et al, 1995), en els peus terminals astrocitaris contactant amb capil·lars i arterioles en capes específiques del hipocamp (Sík et al, 2000), en la glia de Bergmann i en oligodendròcits (Blanz et al, 2007). L'activació dels receptors GABA pot resultar en la obertura de CIC-2 resultant en un augment del Cl<sup>-</sup> intracel·lular per sobre de l'equilibri iònic, assegurant una resposta inhibidòria (Staley et al, 1996). S'ha suggerit que la pèrdua completa o parcial de la funció de CIC-2 és suficient per donar lloc a epilèpsia (Haug et al, 2003; D'Agostino et al, 2004). No obstant, no s'ha pogut demostrar una connexió directa entre mutacions en *CLCN2* i epilèpsia. Mentre que el treball de Haug et al (del qual els autors s'han retractat) presenta que unes variants de *CLCN2* són causants d'epilèpsia, un altre estudi proclama que aquestes variants no arriben a inserir-se a la membrana plasmàtica i que, per tant, no podrien exercir un efecte dominant negatiu (Niemeyer et al, 2004). A més, s'han identificat variants de *CLCN2* en pacients amb epilèpsia les qual no alteren les propietats biofísiques del canal, a més d'identificar-se també en persones sense epilèpsia (Blanz et al, 2007; D'Agostino et al, 2004). Recolzant aquesta idea, estudis en el ratolí *Clcn2*<sup>-/-</sup> demostren que la manca de CIC-2 no provoca convulsions ni n'altera el llindar quan s'administren fàrmacs proconvulsants (Bösl et al, 2001). Estudis recents de modelatge (Ratté and Prescott, 2011) juntament amb estudis realitzats en els canals *clh-3*, homòlegs de CIC-2 de *C.elegans* (Schriever et al, 1999; Nehrke et al, 2000), indiquen que el paper principal de CIC-2 és la regulació de l'entrada de Cl<sup>-</sup> i no la sortida, regulant la posta d'ous en *C.elegans* per mitjà de la modulació de l'activitat neuronal motora (Branicky et al, 2014).

Estudis recents en el model de ratolí *knock-out* de *CLCN2* mostren un defecte electrofisiològic associat amb l'activació astrocitària, observant-se també evidències de neurodegeneració en la capa CA3 de l'hipocamp (Cortez et al, 2010). Recolzant així la possibilitat que l'expressió de CIC-2 tingui un paper neuroprotector en l'hipocamp adult. Inicialment s'havia descrit que les corrents de CIC-2 es veien reduïdes en astròcits immadurs i en astròcits reactius quan hi tenia lloc una lesió, suggerint un possible paper de CIC-2 en el desenvolupament de les cèl·lules glials (Makara et al, 2003). Més tard, s'apreciava la presència de vacuoles espongiformes en les làmines externes de la mielina en ratolins *CLCN2*<sup>-/-</sup> en edats avançades (Blanz et al, 2007; Bösl et al, 2001). No obstant, el ratolí *knock-out* no presentava defectes neurològics.



### 2.2.2.4 GlialCAM com a subunitat de CIC-2

Experiments de proteòmica en el nostre laboratori van demostrar la interacció directa entre CIC-2 i la proteïna d'adhesió GlialCAM (Jeworutzki et al, 2012). Tot i que el canal és funcional sense la presència de GlialCAM, es considera que GlialCAM és una subunitat beta de CIC-2 perquè la seva coexpressió modifica les propietats biofísiques del canal com un augment en l'amplitud de les corrents, obertura del canal a potencials positius i entrada de clorur a la cèl·lula (Figura 12A i Figura 12B) (Jeworutzki et al, 2012).

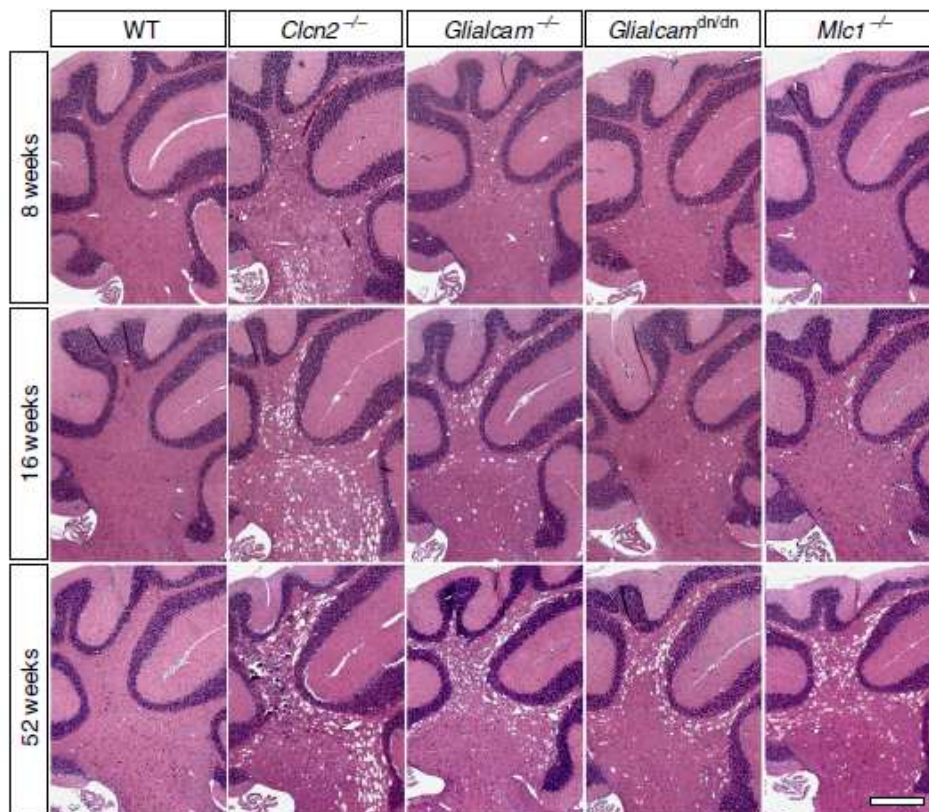


**Figura 12.** A Traces típiques del canal CIC-2 sense (esquerre) i amb GlialCAM (dreta). B Relació I-V de CIC-2 sense (punts negres) i amb (punts blancs) GlialCAM. S'observa com la coexpressió amb GlialCAM incrementa l'amplitud de les corrents i obre el canal a potencials positius permetent un flux d'entrada de clorur. Extret de Jeworutzki et al, 2012.

Aquesta interacció es dona *in vivo* als peus astrocitaris en contacte amb els vasos sanguinis, en la glia de Bergmann i en les fibres mielinitzades (Jeworutzki et al, 2012). GlialCAM alhora colocalitza amb la proteïna MLC1 en els astròcits que es troben en contacte amb els vasos sanguinis i la glia de Bergmann. Mutacions en aquestes dues proteïnes resulten en leucoencefalopatia megalencefàlica amb cists subcorticals (MLC #MIM604004) (Leegwater et al, 2001; López-Hernández et al, 2011). La MLC és una leucodistròfia els pacients de la qual presenten macrocefàlia des de la infància, retard mental, deteriorament cognitiu i motor, ataxia cerebelar i en alguns casos epilèpsia (Van der Knaap et al, 1995). Imatges de ressonància magnètica (MRI) mostren la presència de cists a nivell subcortical en la regió temporal i la substància blanca difosa, indicatiu d'inflament i acumulació d'aigua (Van der Knaap et al, 2012). Estudis en el ratolí *Mlc1*<sup>-/-</sup> mostren la deslocalització de GlialCAM i CIC-2 en la glia de Bergmann, de la mateixa manera que s'observa en la biòpsia d'un pacient de MLC (Sirisi et al, 2014). És molt interessant veure com en el ratolí *GlialCAM*<sup>-/-</sup>, *Mlc1* i CIC-2 també es deslocalitzen (Hoegg-Beiler et al, 2014). Sorprenentment, en el ratolí *Cln2*<sup>-/-</sup>, tant els nivells de *Mlc1* com GlialCAM es mantenen intactes (Hoegg-Beiler et al, 2014). Aquests resultats conclouen que la presència de *Mlc1* és necessària per la correcta localització cel·lular de GlialCAM, i viceversa, mentre que la correcta localització

d'ambdúes és essencial per l'arribada de CIC-2 a les unions cel·lulars. No obstant, és interessant comparar el fenotip vacuolitzant dels models *knock out* per *Mlc1*, *Glialcam* i *Clcn2*, a més d'un animal *knock in* al qual s'ha introduït la mutació puntual dominant G89S de *GlialCAM* trobada en pacients, anomenat *Glialcam<sup>dn/dn</sup>* (López-Hernández et al, 2011).

En seccions de cervell d'animals *Mlc1<sup>-/-</sup>*, *Glialcam<sup>-/-</sup>* i *Glialcam<sup>dn/dn</sup>* a diferents edats s'observa l'aparició progressiva de vacuoles en la mielina (Figura 13) mentre que l'aparició de vacuoles en animals *Clcn2<sup>-/-</sup>* és més ràpida i severa (Hoegg-Beiler et al, 2014). Paral·lelament, el grup de Jentsch va generar un animal hipomòrfic de *Clcn2*, el qual presenta només un 10% de proteïna respecte animals WT (Hoegg-Beiler et al, 2014). És d'interès destacar que aquests animal hipomòrfics no presenten vacuolització de la mielina a les 17 setmanes, fent patent que una activitat residual de CIC-2 és suficient per mantenir la integritat de la mielina. No obstant, quan aquest animal és creuat amb *Glialcam<sup>-/-</sup>*, desenvolupen una vacuolització molt més severa que la dels animals *Glialcam<sup>-/-</sup>* (Hoegg-Beiler et al, 2014).



**Figura 13.** Vacuolització de la mielina en els animals *Mlc1<sup>-/-</sup>*, *Glialcam<sup>-/-</sup>*, *Glialcam<sup>dn/dn</sup>* i *Clcn2<sup>-/-</sup>*. S'aprecia com la vacuolització dels animals *Mlc1<sup>-/-</sup>* és similar a la dels animals *Glialcam<sup>-/-</sup>* i *Glialcam<sup>dn/dn</sup>*, però diferent de la de *Clcn2<sup>-/-</sup>*. A les 8 setmanes, els animals *Mlc1<sup>-/-</sup>*, *Glialcam<sup>-/-</sup>* i *Glialcam<sup>dn/dn</sup>* comencen a presentar vacuoles, mentre que l'animal *Clcn2<sup>-/-</sup>* presenta una vacuolització més avançada. A les 52 setmanes, la vacuolització dels animals *Clcn2<sup>-/-</sup>* continua sent més evident. Modificat de Hoegg-Beiler et al, 2014.

Experiments en cultius primaris d'astròcits de rata als quals s'ha reduït els nivells de GlialCAM mitjançant shRNA, s'observa retenció intracel·lular i menors nivells de Mlc1 en membrana plasmàtica (Capdevila-Nortes et al, 2013). A més, el silenciament de GlialCAM comporta una reducció en l'activitat VRAC, reproduïnt l'efecte degut a la pèrdua de Mlc1 (Ridder et al, 2011). D'altra banda, la sobreexpressió de GlialCAM estableix mutants de Mlc1 que ocasionen la malaltia a més de recuperar les corrents VRAC i revertir el fenotip vacuolitzant del cultiu (Capdevila-Nortes et al, 2013).

Tot i que GlialCAM només interacciona *in vivo* amb MLC1 i CIC-2, també és capaç d'interaccionar amb altres membres de la família CIC *in vitro* en sistema heteròlegs (Jeworutzki et al, 2014). GlialCAM és capaç d'interaccionar amb els canals de la família CIC dirigint-los a les unions cel·lulars. A més, incrementa les corrents de CIC-0 i CIC-1 i ralenteix la cinètica de desactivació de CIC-Ka/Barttin (Jeworutzki et al, 2014). D'altra banda, no és capaç d'interaccionar bioquímica ni funcionalment amb el transportador CIC-5.

El fet d'interaccionar directament amb GlialCAM, de localitzar-se en la mateixa regió i de mostrar una vacuolització similar a la dels pacients afectats per MLC (van der Knaap et al, 2012) feia pensar que el gen *CLCN2* podria jugar un paper clau en la fisiopatologia de la MLC. Malauradament, estudis realitzats en pacients amb MLC que no presenten mutacions ni en el gen *MLC1* ni en *GLIALCAM*, tampoc han mostrat cap mutació en el gen *CLCN2* (Scheper et al, 2010).

S'ha suggerit que la disfunció de CIC-2 pot alterar l'homeòstasi iònica en les cèl·lules glials provocant l'aparició de leucodistrofies tant en humans com en ratolins (Blanz et al, 2007; Depienne et al, 2013). S'ha descrit que mutacions de pèrdua de funció en *CLCN2*, com la variant A500V, causen leucoencefalopatia amb evidències de microvacuolització de la mielina per mitjà d'imatges de MRI (LKPAT, MIM #615651) (Depienne et al, 2013). Aquestes leucoencefalopaties amb edema intramielínic observades varien tant en l'edat d'inici de la malaltia i en la seva presentació clínica, sent l'atàxia cerebelar lleu la característica principal. A diferència del ratolí *knockout* per *CLCN2*, el qual presentava retinopatia, només es va detectar en alguns dels pacients de l'estudi tot i que es creu que la retinopatia mostrada per la resta de pacients era massa subtil per ser detectada al fons de l'ull (Depienne et al, 2013).

S'ha suggerit que CIC-2 pot ser important en el procés del sifoneig de potassi (Blanz et al, 2007), el qual és necessari pel reciclatge de l'alta concentració de potassi degut a la

secreció d'aquest durant un potencial d'acció (Rash, 2010). Recentment, el nostre grup ha demostrat com Mlc1, Glialcam i Clc-2 formen un complex ternari en cultius primaris d'astròcits sota condicions despolaritzants, és a dir, amb un alt contingut de  $K^+$  (Sirisi et al, 2017). La formació del complex Glialcam/Mlc1 modifica la localització cel·lular de Clc-2 i les seves propietats funcionals permetent un fluxe d'entrada de clorur que permet compensar l'excés de potassi, tal com succeeix en condicions d'alta activitat neuronal. Tot i que el mecanisme pel qual Clc-2 s'associa al complex encara no es coneix del tot, se sap que és dependent d'entrada de calci per canals tipus L i per calpaïnes dependents de calci (Sirisi et al, 2017).

## **2.3 Fisiologia renal i de l'oïda interna**

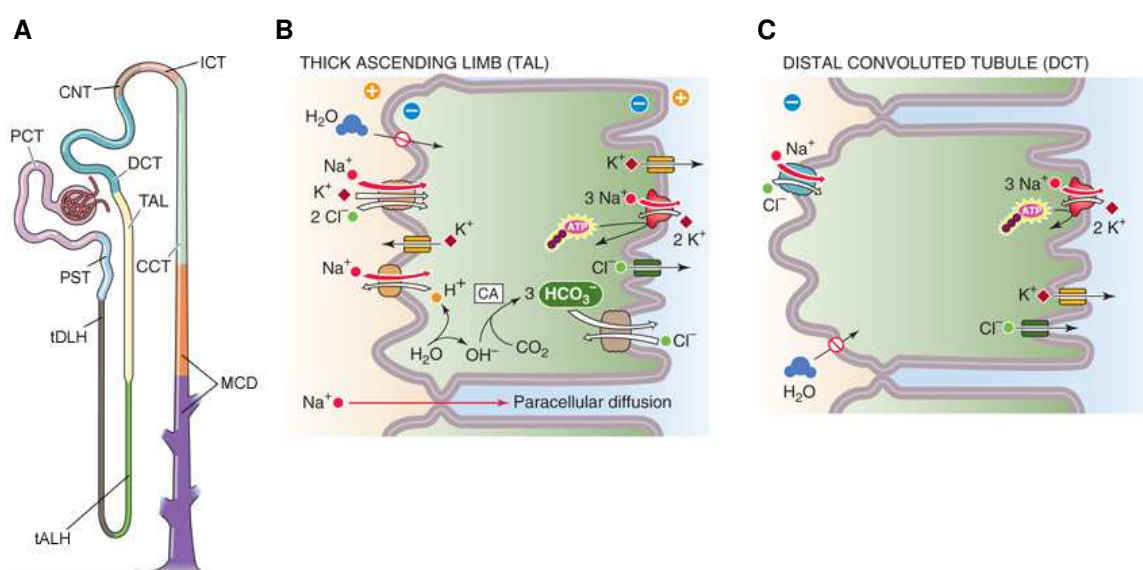
### **2.3.1 Estructura de la nefrona**

El cos humà presenta dos ronyons, unes estructures amb forma similar a una mongeta situats a cada costat de la columna vertebral per darrere del peritoneu. Compleixen les següents funcions vitals: actüen com filtres eliminant productes resultants del metabolisme de les cèl·lules de tot l'organisme i toxines de la sang per la seva excreció en forma d'orina, regulen tant l'equilibri electrolític i àcid-base dels fluïds corporals i, finalment, tenen la capacitat de sintetitzar o activar hormones importants per la generació d'eritròcits, pel metabolisme del calci i per la regulació tant del flux com la pressió sanguínia.

El ronyó està format bàsicament per dues capes, l'escorça (la part més externa i amb aparença granulada) i la mèdulla (la part interna). L'aparença granulada de l'escorça és deguda a la presència del glomèrul, punt de trobada de diversos capil·lars, i a un elevat nombre de túbuls epitelials contornejats. Per contra, la mèdulla no presenta glomèruls, però comprèn un alta densitat de túbuls i vasos sanguinis disposats paral·lelament.

Cada ronyó està format per entre 800.000 i 1.200.000 nefrones. La nefrona és la unitat funcional del ronyó i es considera que cada nefrona és una unitat independent fins el punt en què el tub col·lector d'una nefrona es fusiona amb els tubs col·lectors d'altres nefrones. Una nefrona està formada per un glomèrul i un túbul. El glomèrul és l'agrupació de vasos sanguinis pel qual es filtrarà el plasma. El túbul està format per un epiteli altament especialitzat que consta de diferents segments i la seva funció consisteix en convertir el filtrat del plasma en orina. Els vasos i l'epiteli estan en contacte a un extrem del túbul, en una regió anomenada càpsula de Bowman o glomerular. La càpsula envolta el glomèrul i l'espai de Bowman, que és continu a la

llum del túbul epitelial. El filtrat passarà dels vasos sanguinis al túbul justament en aquesta regió. Els diferents segments dels túbuls comprenen, a més de la càpsula de Bowman, el túbul proximal, les branques primes descendent i ascendent de la nança de Henle (tDLH i tALH, respectivament), la branca gruixuda ascendent de la nança de Henle (TAL), el túbul contornejat distal (DCT) i el túbul connector (CT). Dins el segment proximal es distingeixen dues regions, primer la part proximal contornejada (PCT) seguida de la part proximal recta (PST). El túbul connector continua i dona lloc al túbul connector inicial (ICT) i, la fusió de diversos ICT provinents de diferents nefrones, convergeixen en el túbul col·lector cortical (CCT) i continua a través del túbul col·lector medul·lar (MCD) (Figura 14).



**Figura 14.** **A** Estructura d'una nefrona humana. **B** Absorció de NaCl en la branca gruixuda ascendent de la nança de Henle (TAL). **C** Absorció de NaCl en el túbul contornejat distal (DCT). Extret de Boron i Boulpaep, 2012.

### 2.3.2 Reabsorció de sals

La formació d'orina a partir del plasma filtrat s'aconsegueix gràcies a que cada segment de la nefrona és permeable a determinats osmòlits mentre que és impermeable per uns altres. D'aquesta manera, uns segments s'encarreguen de reabsorbir Na<sup>+</sup> i Cl<sup>-</sup> mentre que uns altres absorbeixen aminoàcids o glucosa i d'altres secreten urea a la llum del túbul. Tot aquest moviment d'ions i soluts orgànics requereix de l'acció orquestrada de diversos canals i transportadors presents tant en la membrana apical com basolateral de les cèl·lules epitelials. A continuació s'explica el procés de reabsorció del clorur de sodi, NaCl.

El túbul proximal, tant el PCT com el PST, és impermeable a Na<sup>+</sup> i Cl<sup>-</sup> i altament permeable a aigua gràcies a la gran densitat d'aquaporina 1. Tot i que es dona un transport passiu mínim tant de Na<sup>+</sup> com de Cl<sup>-</sup> des de la llum del túbul cap a l'interior

de les cèl·lules, l'absorció d'aigua fa que la concentració de  $\text{Na}^+$  a la llum del túbul no varii en aquest segment (absorció isosmòtica). No obstant, els segments de les branques primes i, especialment, la branca gruixuda ascendent de la nança de Henle són impermeables a l'aigua i altament permeables al  $\text{Na}^+$  i al  $\text{Cl}^-$ . En la membrana apical del TAL hi ha present una alta densitat del cotransportador  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$  NKCC2 que acopla el moviment d'entrada de 1  $\text{Na}^+$ , 1  $\text{K}^+$  i 2  $\text{Cl}^-$  gràcies als gradients de concentració de  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$  (altes concentracions luminal i baixes a l'interior de les cèl·lules epitelials) i de manera electroneutra. La presència de canals de  $\text{K}^+$  apicals faciliten el reciclat del  $\text{K}^+$ , reposant el potassi luminal i mantenint així el funcionament del transportador NKCC2. En aquest cas, el compartiment luminal esdevé hipoosmòtic. Per aquesta raó, el TAL també se l'anomena segment diluent. El segment DCT també és impermeable a l'aigua i reabsorbeix  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$ , tot i que a través del cotransportador  $\text{Na}/\text{Cl}$  NCC, el qual és independent de  $\text{K}^+$ . En el ICT i CCT s'hi diferencien dos tipus cel·lulars, les cèl·lules principals i les cèl·lules intercalades. Les cèl·lules principals s'encarreguen de l'absorció de  $\text{Na}^+$  (cal destacar que la taxa d'absorció és molt menor en aquest segment) a través del canal  $\text{EnaC}$  mentre que el  $\text{Cl}^-$  s'absorbeix gràcies a l'activitat de l'intercanviador  $\text{Cl}-\text{HCO}_3$  de les cèl·lules intercalades. Finalment, el segment MCD absorbeix una petita part del  $\text{Na}^+$  que resta del filtrat, també a través del canal  $\text{ENaC}$ . Per completar el procés d'absorció de tots aquests soluts és necessària una via de sortida de les cèl·lules epitelials. En el cas del  $\text{Na}^+$  s'aconsegueix gràcies a la presència basolateral de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  mentre que pel  $\text{Cl}^-$  es dona a través dels canals  $\text{ClCKa}$  i  $\text{ClCKb}$ , tots dos de la família de proteïnes  $\text{ClC}$ .

### 2.3.3 Cèl·lules ciliades i mecanotransducció en l'oïda interna

Tant el sistema vestibular com el sistema auditiu es troben en l'oïda interna i presenten un tipus cel·lular altament especialitzat per la transducció del so, les cèl·lules ciliades. Les cèl·lules ciliades es troben distribuïdes en un conjunt de cavitats i tubs interconnectats anomenat laberint membranós. Aquest laberint comprèn el sistema vestibular i l'element del sistema auditiu, la còclea. Aquest tipus cel·lular són cèl·lules epitelials polaritzades i presenten diversos feixos de cilis de diferents longituds anomenats *stereocilia* en la membrana apical. Els *stereocilia* estan formats per filaments d'actina i es troben en contacte entre ells dins d'un mateix feix. Aquestes cèl·lules ciliades són mecanoreceptors que presenten la capacitat de detectar moviments molt petits gràcies al moviment dels *stereocilia*.

L'epiteli del qual formen part manté la perilimfa separada de l'endolimfa. La perilimfa està en contacte amb la membrana basolateral de les cèl·lules ciliades i la seva

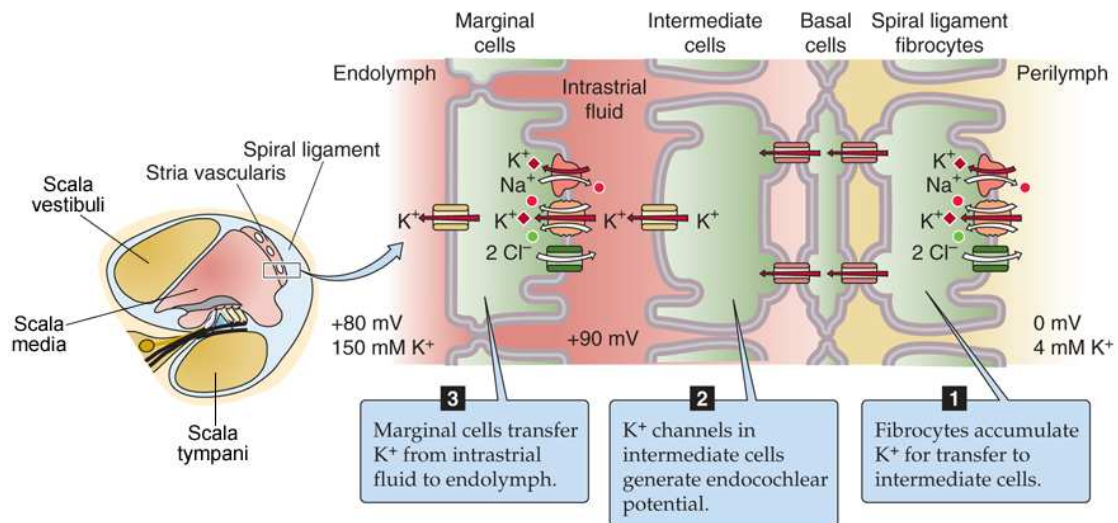
composició presenta una baixa concentració de  $K^+$  i alta concentració de  $Na^+$ . Per contra, la endolimfa, en contacte amb els *stereocilia*, presenta una alta concentració de  $K^+$  i baixa en  $Na^+$ . L'estímul necessari per activar les cèl·lules ciliades és el moviment dels *stereocilia*. Si el moviment es dona en direcció al *stereocilia* més llarg, la cèl·lula s'excitarà i es despolaritzarà, mentre que si el moviment es dona en direcció oposada, la cèl·lula ciliada s'hiperpolaritzarà. La mecanotransducció del so es dona gràcies a l'acoplament del moviment dels *stereocilia* amb l'obertura de canals apicals catiónics no selectius, sent la major part de la corrent d'entrada generada per  $K^+$ . La cèl·lula ciliada es despolaritzarà i ocasionarà l'alliberació de vesícules amb la conseqüent estimulació de la neurona sensorial postsinàptica.

### 2.3.4 Sistema auditiu. Potencial endococlear

La còclea és una estructura tubular amb forma de cargol i està dividida en tres compartiments separats per dues membranes. Per un costat, trobem la *scala vestibuli*, per on entren les vibracions a l'oïda interna. Aquest compartiment es troba en contacte amb la membrana de Reissner, que fa de separador entre la *scala vestibuli* i el compartiment intermig, la *scala media*. Alhora, aquesta es troba aïllada de la *scala tympani* gràcies a la membrana basilar. La *scala tympani* desemboca en l'oïda mitjana. Tant la *scala vestibuli* com la *scala tympani* contenen perilimfa, mentre que la *scala media* conté endolimfa.

La endolimfa del sistema auditiu presenta un voltatge de +80 mV, respecte la perilimfa. Aquesta diferència de potencial, anomenat potencial endococlear, és el responsable de la transducció del so en les cèl·lules ciliades. La pèrdua d'aquest potencial provoca pèrdua auditiva. El potencial endococlear és generat per la *stria vascularis*. La *stria vascularis* està formada per una primera capa de cèl·lules marginals, que separen la endolimfa del líquid intrastrial, un compartiment dins la *stria vascularis*. Una segona capa de cèl·lules, les cèl·lules basals, separen el compartiment intrastrial del líquid intersticial, que es troba en contacte amb la perilimfa. Per la generació del potencial endococlear (Figura 15), unes cèl·lules anomenades fibròcits capten  $K^+$  i a través de les unions *gap*, es manté un alt nivell de  $K^+$  intracel·lular en les cèl·lules intermitjes. Degut a la baixa concentració de  $K^+$  al compartiment intrastrial i l'alta concentració intracel·lular en les cèl·lules intermitjes, el potencial d'equilibri en aquestes cèl·lules és tant negatiu que resulta en la sortida de  $K^+$  cap al compartiment intrastrial, a través del canal de potassi KCNJ10. Finalment, les cèl·lules marginals transfereixen el  $K^+$  des del compartiment intrastrial a la endolimfa a través dels canals KCNQ1/KCNE1, mantenint

així la baixa concentració de  $K^+$  de l'espai intrastrial i assegurant el potencial endococlear.



**Figura 15.** Generació del potencial endococlear. El  $K^+$  és captat pels fibrocits i a través d'unions gap és transportat a les cèl·lules intermèdies, on degut a l'elevada concentració intracel·lular de  $K^+$  i baixa en el compartiment intrastrial, el potassi serà secretat en aquest compartiment. Seguidament, les cèl·lules marginals recaptaran aquest  $K^+$  i l'alliberaran a la endolimfa. Modificat de Boron i Boulpaep, 2012.

Entre els diferents tipus de cèl·lules que formen l'epiteli que recobreix els òrgans vestibulars es troben les cèl·lules fosques vestibulars, la funció de les quals és l'enriquiment de potassi a la endolimfa. El mecanisme de secreció és molt similar al del sistema auditiu.

### 2.3.5 Enriquiment de potassi de la endolimfa

La captació de  $K^+$  de la perilimfa pels fibrocits i del compartiment intrastrial per part de les cèl·lules marginals es du a terme gràcies a l'acció del cotransportador de  $Na^+-K^+-2Cl^-$  NKCC1. Tenint en compte que la concentració de  $Cl^-$  és molt baixa en aquests dos fluids, és evident la necessitat d'algun mecanisme que aportí un subministre de clorur per tal d'assegurar el potencial endococlear i mantenir l'alta concentració de potassi de la endolimfa. Per això, aquestes cèl·lules (i les cèl·lules fosques del sistema vestibular) expressen els canals  $ClC-Ka$  i  $ClC-Kb$  juntament amb la seva subunitat Barttin en la membrana basolateral, oferint una via de reciclatge, mantenint el potencial endococlear i, per tant, afavorint l'alliberació de  $K^+$ .

### 2.3.6 $ClC-K$ i síndrome de Bartter

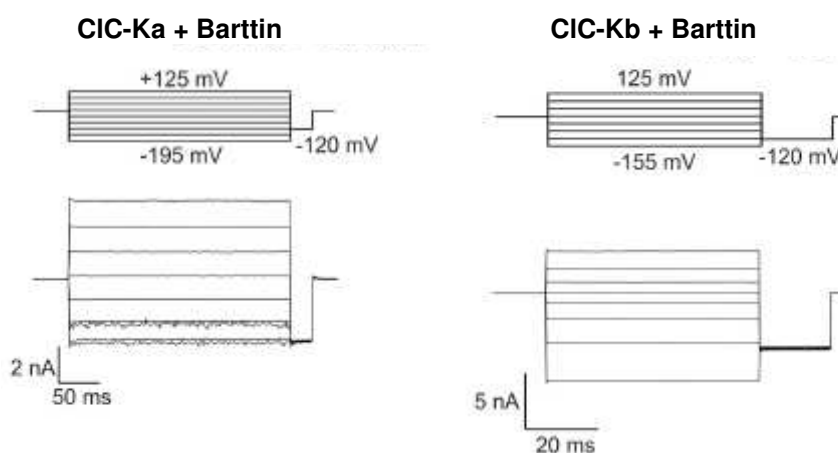
#### 2.3.6.1 Propietats biofísiques dels canals $ClC-K$

Els canals  $ClC-Ka$  i  $ClC-Kb$  són proteïnes de 687 aminoàcids amb un pes de 75 kDa i són codificats pels gens *CLCKNA* i *CLCKNB* (Kieferle et al, 1994), respectivament. Els



dos gens es troben molt propers en el genoma, suggerint una duplicació gènica recent. Aquestes dues proteïnes comparteixen un 90% d'identitat a nivell de seqüència primària i un 80% amb els seus homòlegs en rata, anomenats CIC-K1 i CIC-K2 (Uchida et al, 1993; Kieferle et al, 1994).

El primer que es va clonar va ser CIC-K1 i els primers estudis d'expressió per RT-PCR mostraven una alta expressió en ronyó. Per obtenir més detalls, van examinar l'expressió en segments disseccionants de nefrona demostrant que CIC-K1 es troba específicament en la branca prima ascendent de la nança de Henle (Uchida et al, 1993), la zona amb més alta permeabilitat al  $\text{Cl}^-$  (Imai i Kokko, 1974) i no tan abundant en la branca prima descendent de la nança de Henle, part del túbul col·lector medul·lar i part del segment proximal. Observen com els nivells de mRNA de CIC-K1 augmenten fins a 4 vegades quan els animals són privats de la ingesta d'aigua, suggerint un paper important en el mecanisme de concentració de la orina (Uchida et al, 1993). L'expressió de CIC-K1 en oòcits de *Xenopus* mostra unes corrents ràpidament activades tant per hiperpolarització com per despolarització (Figura 16) (Uchida et al, 1993; Waldegger i Jentsch, 2000) independents del temps, sensibles a pH (augment de l'amplitud de les corrents fins a pH 8 i caiguda de les corrents quan el medi s'acidifica a pH 6.5) i activades per calci extracel·lular. Presenta la següent selectivitat iònica:  $\text{Br}^- > \text{NO}_3^- = \text{Cl}^- > \text{I}^-$  (Waldegger i Jentsch, 2000). Es creu que l'efecte del calci pot ser a través de la interacció del loop I-J (Gradogna et al, 2010; Gradogna et al, 2012).



**Figura 16.** Traces típiques dels canals CIC-Ka (esquerre) i CIC-Kb (dreta) en coexpressió amb Barttin. Ambdós canals estan oberts tant a potencials positius com negatius. Extret de Riazuddin et al, 2009.

Els canals CIC-K són els únics CIC que no presenten un aminoàcid hidrofòbic, ja sigui valina o isoleucina, en la posició del *gating glutamate*. La mutació d'aquesta valina a glutamat genera la dependència al voltatge, ocasiona que s'activi lentament per hiperpolarització i modifica la selectivitat iònica per  $\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{NO}_3^- = \text{I}^-$  (Waldegger i

Jentsch, 2000). L'efecte del pH i del calci extracel·lular mantenen els seus efectes en el mutant. Cap proteïna CIC-K coneguda presenta el *gating glutamate* i el fet que tinguin un comportament ohmic (relació I-V linial) fan que sigui ideal pel transport transepitelial on el potencial de membrana varia en gran mesura, com és el cas del ronyó.

La mutació R351W en CIC-Kb, identificada en un pacient de síndrome de Bartter, elimina la modulació pel calci i redueix l'efecte d'acidificació en l'activitat del canal (Yu et al, 2009). La mutació equivalent en CIC-Ka no provoca cap alteració (Gradogna et al, 2010). De la mateixa manera, la mutació puntual R538P en CIC-Kb, però no en CIC-Ka, aboleix l'efecte activador del calci (Martínez i Maduke, 2008).

Tant estudis d'immunocitoquímica (Uchida et al, 1995) com genètics (Simon et al, 1997; Matsumura et al, 1999) apuntaven que els canals CIC-K tenien un paper en el transport de sals. No obstant, el no ser capaços de registrar activitat d'aquestes proteïnes feia pensar que en els sistemes d'expressió heteròlegs probablement faltava algun element que promogués aquesta activitat (Waldegger i Jentsch, 2000). Efectivament, l'any 2001 es va identificar Barttin com a subunitat  $\beta$  tant de CIC-Ka com CIC-Kb (Estévez et al, 2001). Barttin és una proteïna de membrana formada per dos dominis transmembrana i els extrems N i C terminal citosòlics. És codificada pel gen *BSND*, mutacions en el qual ocasionen el síndrome de Bartter tipus IV (Birkenhäger et al, 2001). La coexpressió de CIC-K1 amb Barttin provoca un augment significatiu de l'amplitud de les corrents. Així doncs, la coexpressió de Barttin amb CIC-Ka o CIC-Kb va permetre registrar per primer cop l'activitat d'aquests canals i determinar la selectivitat iònica de cadascun, sent  $\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{NO}_3^- > \text{I}^-$  per CIC-Ka i  $\text{Cl}^- > \text{Br}^- = \text{NO}_3^- \geq \text{I}^-$  per CIC-Kb. La interacció dels canals humans amb Barttin faciliten la sortida d'aquests del reticle endoplasmàtic i inserir-se en la membrana plasmàtica (Estévez et al, 2001; Waldegger et al, 2002, Hayama et al, 2003; Scholl et al, 2006). De la mateixa manera que CIC-K1, les corrents generades pels complexos Barttin+CIC-Ka/b també es veuen incrementades per la presència de calci extracel·lular (Estévez et al, 2001). No obstant, la coexpressió de CIC-K1 amb Barttin fa que deixi de respondre a l'augment de calci, saturant-se a concentracions fisiològiques de calci (Waldegger et al, 2002). Tot i aquest possible paper modulador del calci extracel·lular, la rellevància i mecanisme fisiològics són encara desconeguts. A més, Barttin modifica el *gating* només de les proteïnes CIC-K i n'incrementa les corrents de canal únic (Scholl et al, 2006; Fischer et al, 2010;).

Un treball més recent dóna suport a la importància dels dominis CBS dels CIC. L'estudi d'una mutació freqüent en la població asiàtica en CIC-Kb, W610X, provoca un *stop codon* prematur delecionant el segon domini CBS (Stölting et al, 2015). És interessant observar que aquest mutant manté la capacitat d'interaccionar físicament amb Barttin però és insensible a la seva regulació. Tot i que una gran proporció del complexe CIC-Kb W610X – Barttin es troba retingut al reticle endoplasmàtic, el canal és actiu (Stölting et al, 2015). Els resultats obtinguts delecionant diferents fragments del C terminal en el mutant CIC-K1 V166E han permès determinar la rellevància del domini CBS2 per la regulació del *common gating* a través de Barttin (Scholl et al, 2006; Fischer et al, 2010; Stölting et al, 2015).

La localització dels CIC-K al ronyó i a l'oïda interna van ser determinades per assajos d'immunocitoquímica. No obstant, l'alta similitud en la seqüència d'aminoàcids impedeix la generació d'anticossos que discriminin entre les dues isoformes. Per això es van complementar amb estudis amb ratolins que expressen EGFP sota el control del promotor de CIC-Kb (Kobayashi et al, 2002) i ratolins deficients per CIC-K1 (Matsumura et al, 1999; Kobayashi et al, 2001). Gràcies a aquests estudis es va poder determinar que CIC-K1 es troba específicament en la branca prima de la nança de Henle. No obstant, la localització tant apical com basolateral (Uchida et al, 1995) o només basolateral (Vandewalle et al, 1997) continua en debat. Per contra, CIC-K2 es troba exclusivament en la membrana basolateral en la branca ample ascendent de la nança de Henle, en el túbul contornejat distal i en les cèl·lules intercalades del túbul connector. En l'oïda interna, les dues proteïnes es troben en la membrana basolateral de les cèl·lules marginals de la *stria vascularis* i en les cèl·lules fosques de l'òrgan vestibular (Estévez et al, 2001; Sage i Marcus, 2001; Kobayashi et al, 2002). A més, la immunocitoquímica contra Barttin colocalitza amb les proteïnes CIC-K, demostrant la interacció *in vivo* (Estévez et al, 2001).

Recentment s'ha generat un ratolí *knockout* per CIC-K2 i reproduïx les principals característiques del síndrome de Bartter, pèrdua de sals per la orina, hipopotassèmia i alcalosi metabòlica (Hennings et al, 2016). Les cries homozigotes no arriben a desenvolupar-se completament, resultant en mortalitat (Hennings et al, 2016). Assajos d'immunolocalització amb aquest animal han permès confirmar que CIC-K1 es troba en la branca prima de la nança de Henle però també en la branca gruixuda de la nança de Henle de la mèdulla, mentre que el marcatge prèviament descrit per CIC-K2 (Kobayashi et al, 2001), desapareix completament (Hennings et al, 2016). La disrupció de CIC-K2 aboleix la resposta als fàrmacs furosemida i tiazida, on l'increment de sodi

en l'orina és evident en animals WT i absent en els mutants (Hennings et al, 2016). Igual que alguns pacients, presenten alts nivells de PGE2 en orina i un increment en els nivells de mRNA de renina.

Varis grups han demostrat la interacció directa entre els CIC-K i Barttin per coimmunoprecipitació (Waldegger et al, 2002; Hayama et al, 2003) i un altre grup ha suggerit dos possibles lloc d'unió en les hèlix B i J (Tajima et al, 2007). El llarg extrem C terminal de Barttin presenta la seqüència PQPPYVRL, la qual es considera una seqüència consens dels motius d'internalització del tipus YXXL, on X és qualsevol aminoàcid (Bonifacino i Traub, 2003), tot i que també és similar al motius PY que interaccionen amb els dominis WW (Einbond i Sudol, 1996; Otte et al, 2003), dominis presents en ubiquitines lligases. La internalització per motius PY ha estat descrita per altres canals, com el ENaC (Staub et al, 1997) i per CIC-5 (Schwake et al, 2001; Hryciw et al, 2004). La substitució de la tirosina per alanina incrementa les corrents d'ambdues proteïnes CIC-K (Estévez et al, 2001). No obstant, el mecanisme d'endocitosi continua sent desconegut, deixant oberta la possibilitat que sigui per la via de Nedd4-2 o per la via del complex AP2 (Embark et al, 2004).

### 2.3.6.2 Síndrome de Bartter

Les funcions fisiològiques de les proteïnes CIC-K i Barttin van ser descobertes degut a que la seva pèrdua de funció ocasiona malalties en humans i ratolí. Mutacions en el gen *CLCNKB* donen lloc al síndrome de Bartter tipus III (MIM #607364) resultant en una pèrdua important de sals en el ronyó (Simon et al, 1997). També provoca poliúria, polidipsia, hipopotassèmia, alcalosi i nivells elevats de les hormones renina i aldosterona. Mutacions en el gen de Barttin provoquen el síndrome de Bartter tipus IV (MIM #602522) (Birkehäger et al, 2001). És el tipus més sever i es caracteritza per sordesa i símptomes renals encara més greus que en el tipus III. Altres components implicats en la reabsorció de NaCl en el ronyó també provoquen síndrome de Bartter. El cotransportador NKCC2, la principal porta d'entrada apical pel sodi i clorur, ocasiona el tipus I (MIM #601678) (Simon et al, 1996a). El potassi que és cotransportat per NKCC2, és reciclat a través del canal apical ROMK, mutacions en el qual resulta en el tipus II (MIM #241200) (Simon et al, 1996b).

En ratolí, la pèrdua de CIC-K1 provoca diabetis insípida nefrogènica, caracteritzada per un defecte en la concentració de la orina (Matsumura et al, 1999). Aquestes dades evidencien el paper essencial de CIC-K1 d'establir l'alta osmolaritat en la mèdula renal necessària perquè es doni l'absorció d'aigua en el túbul col·lector (Fenton i

Knepper, 2007). Efectivament, els ronyons de ratolins deficients per CIC-K1 presenten una reducció dramàtica de la concentració de soluts en la mèdulla (Akizuki et al, 2001). Només s'ha identificat un pacient que presenta mutacions tant en CIC-Ka com CIC-Kb (Schlingmann et al, 2004). El seu fenotip és molt similar al descrit pel síndrome de Bartter tipus IV.

Perquè es doni sordesa s'ha de perdre la funció dels dos complexos Barttin+CIC-Ka/b, ja sigui per mutacions en Barttin (Birkenhäger et al, 2001; Estévez et al, 2001) o molt rarament, per mutacions en els dos canals (Schlingmann et al, 2004). A més, la pèrdua de Barttin també afecta al transport de sals en la branca prima, on s'expressa només CIC-Ka, explicant d'aquesta manera perquè els símptomes són més severes que en el tipus III.

Com s'ha descrit en la secció corresponent, les cèl·lules ciliades necessiten d'un entorn ric en  $K^+$  per despolaritzar-se i aquest s'aconsegueix gràcies al potencial endococlear generat per l'epiteli de la *stria vascularis*. En la membrana basolateral, el cotransportador NKCC1 i la bomba  $Na^+/K^+$  transporten  $K^+$  a l'interior d'aquestes cèl·lules. En la mateixa membrana basolateral, la presència de CIC-Ka i CIC-Kb juntament amb Barttin faciliten el reciclat del  $Cl^-$ , despolaritzant la membrana i generant el potencial positiu de la endolimfa. El  $K^+$  surt passivament a través dels canals KCNQ1/KCNE1 apicals. Mutacions en aquests canals de potassi també provoquen sordesa, corroborant així aquest model fisiològic (Neyroud et al, 1997; Schulze-Bahr et al, 1997). La disrupció de Barttin específicament en l'oïda interna de ratolins provoca la pèrdua del potencial endococlear i la degeneració de les cèl·lules ciliades (Rickheit et al, 2008).

Més recentment, s'ha identificat una mutació benigna en el gen *BSDN* que provoca sordesa però, sorprenentment, no hi presenta símptomes renals (Riazuddin et al, 2009).

### 2.3.6.3 Farmacologia de CIC-K

Des del punt de vista farmacològic, els inhibidors dels canals CIC-K serien molt interessants pel seu ús com a diurètics mentre que els activadors serien molt útils pel tractament del síndrome de Bartter on encara hi hagués una activitat residual de CIC-K (Zifarelli et al, 2010). L'aplicació de l'àcid 2-(p-clorofenoxi) propionoi (CPP) i els seus derivats aconseguixen bloquejar l'activitat de CIC-K1 en oòcits de *Xenopus* (Liantonio et al, 2003; Liantonio et al, 2004). Aquest efecte es veu potenciat al disminuir la

concentració extracel·lular de clorur, suggerint que el compost podria estar interaccionant amb el porus (Liantonio et al, 2004). Altres inhibidors de canals de clorur, com els DIDS, van demostrar bloquejar el canal amb una eficiència equiparable a la del derivat de CPP, tot i que de manera irreversible (Liantonio et al, 2004). S'observa el mateix efecte per CIC-Ka (Picollo et al, 2004). Sorprenentment, CIC-Kb resulta ser molt menys sensible als dos compostos respecte CIC-Ka. En aquest mateix treball identifiquen dos residus responsables d'aquesta diferència de sensibilitat, N68/D68 i G72/E72 pertanyents a CIC-Ka/CIC-Kb (Picollo et al, 2004). L'ús d'un derivat a partir de 3-fenil-CPP anomenat RT-93 ha demostrat ser un bloquejant molt potent de CIC-Ka i CIC-Kb amb la mateixa eficiència, sent fins el moment l'inhibidor més potent de CIC-K (Liantonio et al, 2008). La furosemida, un fàrmac utilitzat actualment com a diurètic bloquejant de NKCC2, inhibeix les corrents de manera dosi dependent de CIC-K1 (Uchida et al, 1995). En ratolins, el tractament amb furosemida provoca una menor expressió de CIC-K1 i Barttin (Wolf et al, 2003).

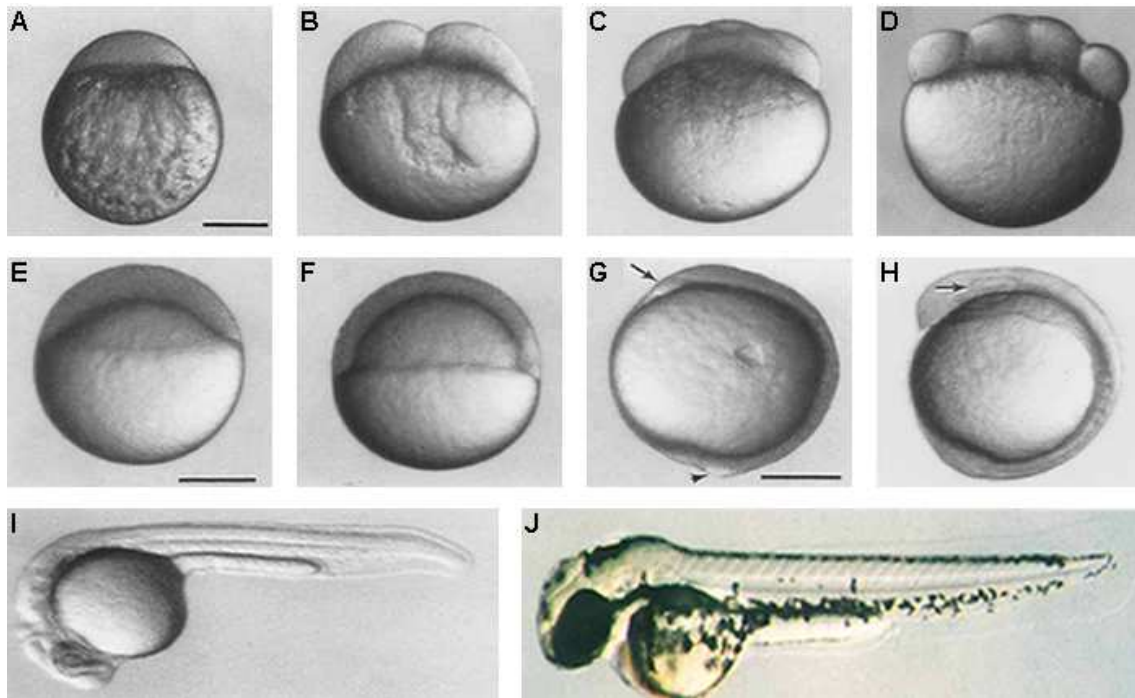
L'aplicació de l'antiinflamatori no esteroïdal àcid niflúmic (NFA) incrementa les corrents tant de CIC-Ka com de CIC-Kb (Liantonio et al, 2006). Curiosament, l'aplicació d'àcid flufenàmic o concentracions elevades de NFA tenen un efecte inhibidor només sobre CIC-Ka (Liantonio et al, 2006). A més, l'ús de mutants de CIC-Ka insensibles a l'efecte inhibidor de 3-fenil-CPP continuen sent sensibles a inhibició per NFA, demostrant diferents llocs d'unió pels dos compostos (Picollo et al, 2007). La concentració extracel·lular de clorur no té cap efecte en la inhibició per NFA, suggerint que el lloc d'unió es troba allunyat del porus (Picollo et al, 2007).

### 3. El peix zebra com a model animal

Per continuar avançant en la cerca del coneixement del funcionament dels éssers vius tant a nivell cel·lular com molecular és necessari l'ús d'animals de laboratori. Els animals de laboratori més utilitzats sempre han estat la rata i el ratolí, ja que són mamífers i l'alta similitud entre els processos fisiològics i les proteïnes participants han fet que siguin la primera opció alhora de treballar amb animals. No obstant, degut a un elevat cost de manteniment i el temps de generació d'animals mutants, han fet que diferents laboratoris busquin organismes alternatius que permetin continuar la seva recerca, com la mosca de la fruita o el peix zebra.

El peix zebra és un petit teleosti d'aigua dolça que cada cop està guanyant més i més rellevància com a model animal (Langheinrich, 2003). Les característiques que el fan un model tan atractiu són que és un vertebrat, la gran majoria de gens en humans es troben també en el genoma del peix zebra, la similitud en processos fisiològics, una fàcil manipulació dels animals, un abaratiment del cost de manteniment, una gran quantitat d'ous per parella, la transparència dels embrions durant els primers estadis de desenvolupament (Figura 17) que permeten visualització *in vivo* no invasiva i el desenvolupament en els últims anys d'eines per la manipulació genòmica, des d'eines d'edició genòmica aleatòria (Grunwald i Streisinger, 1992; Solnica-Krezel et al, 1994) a edició dirigida (Hwang et al, 2013) i tècniques de transgènesi (Stuart et al, 1988; Kawakami i Shima, 1999; Scheer i Campos-Ortega, 1999).

L'ús de la transposasa Tol2 ha suposat un gran pas en la generació de línies transgèniques gràcies a la millora de l'eficiència de transgènesi i de la transmissió del transgen per la línia germinal (Kawakami et al, 2004). La transposasa Tol2 és un element autotransponible identificat en medaka (*Oryzias latipes*). S'han descrit els fragments de la Tol2 mínims imprescindibles per dur a terme aquest procés i així s'ha aconseguit generar transgènics en diferents espècies amb una elevada eficiència flanquejant el gen d'interès amb aquestes seqüències essencials (Kawakami i Shima, 1999). A més, el genoma de referència ha estat publicat recentment i s'ha trobat que un 70% dels gens humans presenten almenys un gen ortòleg en peix zebra (Howe et al, 2013). Paral·lelament, gràcies a la identificació, caracterització i mapatge dels gens *Hox* en el peix zebra s'ha descrit que el genoma de l'ancestre comú dels teleostis va patir una duplicació genòmica (Amores et al, 1998; Postlethwait et al, 1998).



**Figura 17.** Estadis de desenvolupament de l'embrió del peix zebra. Estadis d'una (A), dues (B), quatre (C) i vuit cèl·lules (D). En E s'observa un embrió en l'estadi epiboli 30%, pertanyent al període de blàstula. En F es mostra en l'estadi d'anell germinal, pertanyent a l'inici de la gastrulació mentre que en G es mostra el final d'aquest període. En H, es mostra un embrió en l'estadi de 4 somites, pertanyent al període segmentació. S'observa com fins a les 24 hpf (I) l'embrió és completament transparent mentre que a les 48 hpf (J) ja presenta pigmentació en la pell. Modificat de Kimmel et al, 1995.

Els camps que més s'han beneficiat de l'ús del peix zebra són, entre d'altres, els de l'estudi del desenvolupament embrionari, la neurociència, l'estudi del sistema motor, la oncologia i el camp del cribatge de fàrmacs. Moltes de les teràpies de les que disposem avui dia s'han desenvolupat utilitzant cultius cel·lulars, els quals ofereixen la possibilitat d'evaluar l'efectivitat d'un compost per modular la proteïna d'interès, però no és possible evaluar-ne els efectes tòxics derivats. Per aquesta raó, diversos compostos prometedors s'han descartat perquè no han mostrat el mateix efecte en ratolins i/o degut a una alta toxicitat. L'avantatge que ofereix el peix zebra és que permet realitzar assajos d'efectivitat i toxicitat i visualitzar fenotips *in vivo* a gran escala.

En un dels primers estudis realitzats amb aquest animal model amb més de 1000 compostos han permès identificar molècules amb una gran diversitat d'efectes. Alguns presenten efectes letals en els primers estadis de desenvolupament, altres alteren el correcte desenvolupament dels sistema nerviós, afecten al sistema cardiovascular, altres que inhibeixen la pigmentació i altres que alteren el desenvolupament de l'oïda (Peterson et al, 2000). Els autors suggereixen l'ús de petites molècules per modular l'activitat de proteïnes difícils de controlar amb modificacions genètiques, com els factors de transcripció (Peterson et al, 2000).



A més, s'han identificat i generat mutants que reproduïen els fenotips observats en malalties humanes i han permès identificar el gen causant. El mutant *golden* presenta hipopigmentació dels melanòfors de la pell i de l'epiteli de la retina degut a un retard i una reducció en la producció de melanina (Streisinger et al, 1981). Com s'observa en la Figura 18J, un embrió *wild type* de dos dies ja presenta pigmentació en la pell i en la retina, mentre que un embrió *golden* continua sent transparent. Es va identificar l'intercanviador de sodi i calci dependent de potassi *slc25a4* com el responsable d'aquest fenotip i l'anàlisi de polimorfismes d'aquest gen en humans ha permès assignar un paper al gen *SLC24A5* en la pigmentació humana (Lamason et al, 2005).

El mutant *weissherbst* presenta un defecte en l'homeòstasi del ferro, a més d'un defecte en la coloració dels eritròcits, hipocromia, degut a nivells molt baixos d'hemoglobina i les larves moren entre els 7 i 14 dpf (Zon et al, 2000). Es va identificar el gen *ferroportin1* com el principal responsable. En mamífers, codificada pel gen *SLC40A1*, és el principal secretor de ferro (De Domenico et al, 2007a). Les mutacions en ferroportina provoquen un excés de ferro intracel·lular que pot arribar a derivar en mort cel·lular (De Domenico et al, 2006; Pietrangelo, 2011; Zhang et al, 2011). L'expressió en peix zebra de mutants en la ferroportina humana provoca el mateix fenotip (De Domenico et al, 2007b).

El síndrome de Dravet és un trastorn epilèptic infantil sever d'origen genètic, sent el canal de sodi dependent de voltatge  $Na_v1.1$  (codificat pel gen *SCN1A*) el principal responsable (Claes et al, 2001; Claes et al, 2003). Les convulsions no es poden controlar totalment amb els fàrmacs antiepilèptics habituals com el valproat (Rantala et al, 1997), i alguns com la lamotrigina i la carbamazepina les empitjoren encara més (Guerrini et al, 1998; Thanh et al, 2002). El mutant *did*<sup>S552</sup> presenta una mutació puntual al gen *sn1Lab* i també presenta convulsions espontànies resistents a fàrmacs (Baraban et al, 2013). El seu ús en estudis de cribatge ha permès identificar el clemizol, un fàrmac ja comercialitzat, com a potencial inhibidor d'aquestes convulsions resistents (Baraban et al, 2013). Més recentment, aquest mateix grup ha descobert els mecanismes de senyalització per les quals actua. L'administració de lorcaserina també resulta eficaç per controlar la freqüència i la severitat de les convulsions (Griffin et al, 2017).

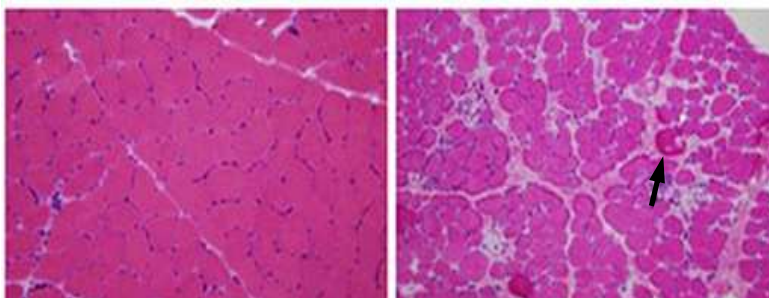
### 3.1 Models de peix zebra per l'estudi de miopaties

Les miopaties són trastorns musculars extremadament rars en els quals l'estructura i/o les funcions bioquímiques i electrofisiològiques de les fibres musculars estan

alterades. Algunes d'aquestes malalties són d'origen genètic mentre que d'altres són adquirides degut a trastorns del sistema immunològic, l'abús de fàrmacs i toxines, trastorns endocrins, alteracions metabòliques o infeccions.

Tot i que el component genètic implicat en moltes d'aquestes malalties és conegut, avui dia continuen sent incurables. Per aquesta raó, s'està fent un gran esforç en la generació de models animals per tal d'esbrinar els mecanismes patològics implicats. El múscul esquelètic del peix zebra comparteix característiques tant a nivell molecular com histològic amb el múscul dels mamífers (Parsons et al, 2002; Guyon et al, 2003; Dou et al, 2008). L'alteració d'algún d'aquests components també ocasionen trastorns musculars (Hirata et al, 2007; Dowling et al, 2009). A més, el sistema muscular representa l'òrgan més gran en els peixos i és visible des de 1dpf. Els models musculars en peix zebra representen d'una manera més propera la severitat dels trastorns humans que no pas els models en ratolí (Berger et al, 2010).

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) és un trastorn muscular degeneratiu ocasionat per la pèrdua de funció de la distrofina resultant en la mort de les cèl·lules musculars (Figura 18).



**Figura 18.** Seccions transversals de múscul sa (esquerre) i d'un pacient amb distrofia muscular de Duchenne (dreta). S'observa com les fibres musculars estan desorganitzades en el pacient de DMD i cèl·lules necròtiques (fletxa). Modificat de Eisenberg et al, 2007.

L'aparició de la malaltia és evident durant la infància degut a un retard en el desenvolupament muscular, seguit de dificultat i pèrdua de la deambulació, desenvolucant finalment en una fallada respiratòria i cardíaca ocasionant inevitablement la mort dels pacients (Emery, 1993). La distrofina serveix d'ancoratge dels filaments d'actina amb la matriu extracel·lular de manera que la pèrdua d'aquesta provoca una inestabilitat estructural a les fibres musculars (Petrof et al, 1993; Ervasti i Sonnemann, 2008). El ratolí *mdx*, el model més utilitzat, comença a presentar els símptomes en estadis més tardans i l'animal homozigot no és letal (Bulfield et al, 1984). El gos deficient per distrofina, presenta un fenotip més sever que el ratolí i més similar a la patologia humana (Zucconi et al, 2009). No obstant, la variabilitat fenotípica i la dificultat de manipulació genètica no el fan el model més adequat.

La mutació *dmd*<sup>ta222a</sup>, també anomenada *sapje*, en homozigosi provoca la pèrdua de distrofina resultant en el despreniment de les fibres musculars i mort dels animals als 30dpf (Granato et al, 1996; Bassett et al, 2003; Widrick et al, 2016). També s'ha identificat un altre mutant, anomenat *sapje-like* que també presenta un fenotip molt similar al mutant *sapje* (Guyon et al, 2009). Aquests models han permès identificar que el tractament amb aminofilina, fluoxetina o dasatinib és beneficiós prevenint el fenotip distròfic (Kawahara et al, 2011; Waugh et al, 2014; Lipscomb et al, 2016). L'administració de dasatinib en peixos *sapje* aconsegueix una millora física dels animals resultant en un increment en l'activitat natatòria, tant en temps com distància (Lipscomb et al, 2016).

Mutacions en el gen del col·làgen VI estan associades amb la distròfia muscular congènita de Ullrich o la miopatia de Bethlem, sent la primera més severa (Jöbsis et al, 1996; Camacho-Vanegas et al, 2001). L'anàlisi del ratolí deficient per aquest gen i de miotubs de pacients ha identificat que la patologia està originada per alts nivells d'apoptosi i disfunció mitocondrial (Irwin et al, 2003; Merlini et al, 2008). La generació d'un model en peix zebra mitjançant *morpholinos* permet recrear un fenotip més similar al dels pacients. Això ha demostrat que el tractament amb ciclosporina A aconsegueix millorar les alteracions motores en aquest model a més de recuperar parcialment la funció mitocondrial i disminuir l'apoptosi (Telfer et al, 2010).

El mutant *accordion* presenta un retard en la relaxació muscular i el seu estudi ha identificat la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa del reticle sarcoplàsmic (SERCA1) com a responsable (Hirata et al, 2004). En humans, mutacions en el gen *SERCA1* provoquen la malaltia de Brody, caracteritzada per una alteració en la relaxació muscular després de la realització d'exercici (MacLennan, 2000). Actualment, no hi ha cap tractament disponible per tractar aquesta malaltia en humans, no obstant, donat que el mutant *accordion* manifesta característiques molt similars a les observades en pacients, és un bon model per tal d'identificar possibles tractaments.

### 3.2 Tècniques d'edició genòmica

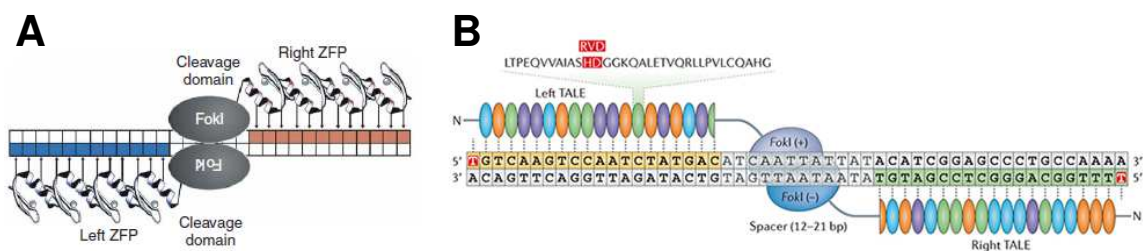
L'administració d'etilnitrosourea (ENU) ha estat un dels mètodes més utilitzats per la generació de peixos mutants, sent les primeres línies identificades a mitjans dels anys 90 (Driever et al, 1996; Haffter et al, 1996). Per generar els mutants sempre s'exposen mascles. L'ENU genera mutacions puntuals aleatòries i gràcies a la tolerància que presenten a la seva exposició, s'aconsegueixen alts nivells de mutagènesi de manera que existeix una alta probabilitat que es generi la mutació al locus desitjat. L'animal

sotmès al tractament amb ENU és creuat amb un animal WT (*outcross*) per generar la generació fundadora F1. A partir d'aquí es poden seguir dues estratègies, anomenades *forward* o *reverse genetics*. L'estratègia *forward* o clàssica consisteix en la identificació de la base genètica responsable d'un fenotip. Per seguir aquesta via, es procedeix a generar les dues següents generacions creuant-les entre elles (*incross*) de manera que aproximadament un 25% dels individus de la F3 seran homozigots per la mutació. Per contra, l'estratègia *reverse* tracta d'identificar la funció que du a terme un gen analitzant el fenotip degut a la pèrdua d'aquest. Per seguir aquesta via, es genera una llibreria de DNA a partir dels individus F1 i a partir d'aquestes llibreries s'identifica la mutació. El mètode més utilitzat per aquest *screening* és el TILLING (targeting induced local lesions in genomes) (Wienholds et al, 2002), que consisteix en l'amplificació de cada locus d'interés individualment per PCR. Un cop identificada la mutació es creuen els animals F1 per obtenir descendència heterozigota i homozigota per la mutació i estudiar-ne el possible fenotip resultant. El centre Wellcome Trust Sanger Institute ha iniciat un projecte a gran escala amb l'objectiu d'aconseguir un al·lel mutant per cada gen codificant en el genoma del peix zebra, el Zebrafish Mutation Project (Kettleborough et al, 2013). Utilitzant la metodologia ENU-TILLING, cada al·lel generat i identificat és afegit en una base de dades pública. A més, conserven mostres d'esperma dels animals F1 de manera que qualsevol laboratori interessat en un dels al·lells publicats pot sol·licitar-lo i obtenir la línia per fertilització *in vitro*. Això ha permès que molts laboratoris que no disposen dels mitjans per realitzar el procés de mutagènesi puguin continuar utilitzant el peix zebra com a model.

L'objectiu de l'ús d'ENU és la generació d'un animal deficient per un gen específic. No obstant, la obtenció d'aquest animal requereix d'un temps d'aproximadament un any, tenint en compte el temps necessari per la obtenció de les següents generacions. En alguns casos, quan s'està testant una llista de gens candidats que podrien estar implicats en un fenotip determinat, resulta més útil la utilització dels *morpholino* per evaluar l'efecte de la pèrdua del gen d'estudi. Els *morpholino* són cadenes d'oligonucleòtids *antisense* sintètics (Summerton i Weller, 1997). A més, són complementaris al mRNA d'interés amb l'objectiu de disminuir els nivells de proteïna codificats per aquest transcrit (Summerton, 1999). S'ha demostrat que tenen la capacitat de bloquejar l'inici de traducció del mRNA tant *in vitro* com *in vivo* unint-se a la regió 5' UTR (Summerton i Weller, 1997; Summerton, 1999). L'any 2000, Nasevicius i Ekker, 2000 utilitzen *morpholinos* contra diversos gens i aconsegueixen observar fenotips molt similars als obtinguts amb línies mutants. A més, s'ha descrit en línies cel·lulars que el disseny de *morpholinos* contra les regions consens d'*splicing*

permeten alterar el procés d'*splicing* d'un pre-mRNA, resultant en una proteïna no funcional (Schmajuk et al, 1999). L'any 2001, el grup de Kimmel aconsegueix aplicar aquesta estratègia en el peix zebra (Draper et al, 2001). Un avantatge dels *splicing morpholino* respecte els clàssics, és que es pot quantificar l'eficiència dels primers sense necessitat d'anticossos (Draper et al, 2001). L'atrofia muscular espinal, provocada per la pèrdua de funció en el gen *SMN1*, resulta en la degeneració de les neurones motores de la banya anterior de l'espina dorsal i acaba provocant la mort de l'individu. Utilitzant els *splicing morpholino* contra el gen *smn* de peix zebra s'ha aconseguit reproduir fenotips relacionats amb la malaltia (McWhorter et al, 2003; Boon et al, 2009), demostrant un cop més la utilitat del peix zebra com a model.

No obstant, per discernir la funció d'un gen o per generar un animal model per estudiar una patologia ocasionada per la pèrdua total de la funció d'un gen, és necessari l'ús de línies mutants estables. Com s'ha explicat anteriorment en aquesta secció, l'exposició a ENU ha demostrat ser una tècnica útil per aquest propòsit. Un dels inconvenients que presenta és la incapacitat de controlar el locus on es produirà la mutació. Per aquesta raó, el desenvolupament de tècniques d'edició genòmica dirigida van obrir un nou ventall de possibilitats. La primera generació d'aquestes tècniques amb una bona eficiència de mutagènesi són les nucleases *zinc-finger* (ZFN). Les ZFN consisteixen en proteïnes de fusió artificials que enllacen un domini d'unió al DNA del tipus *zinc-finger* amb el domini actiu d'una nucleasa inespecífica, habitualment *FokI* (Figura 19A) (Kim et al, 1996). Els dominis d'unió al DNA del tipus *zinc-finger* presenten la seqüència (Tyr, Phe)-Xaa-Cys-Xaa<sub>2-4</sub>-Cys-Xaa<sub>3</sub>-Phe-Xaa<sub>5</sub>-LeuXaa<sub>2</sub>-His-Xaa<sub>3-5</sub>-His, sent Xaa qualsevol aminoàcid, repetida en tàndem (Berg, 1988).

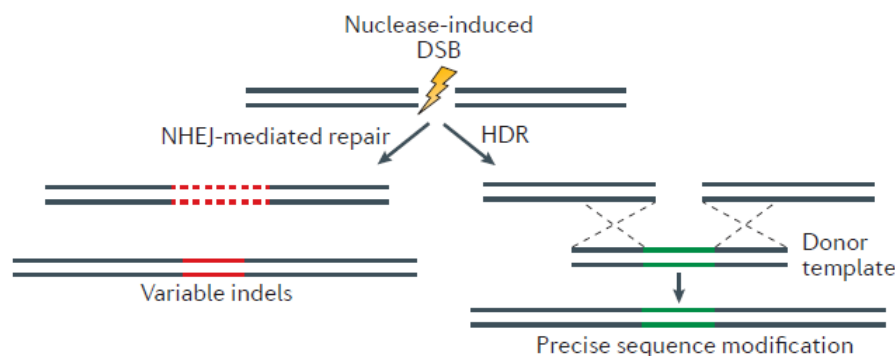


**Figura 19.** Nucleases programables per edició genòmica dirigida. Estructura de les *zinc-finger* (A) i del sistema TALEN (B). En ambdós casos, la nucleasa FokI induirà el trencament de la doble cadena en la regió del *linker* en les ZFN o *spacer* en les TALEN. Extret de Miller et al, 2007; Kim i Kim, 2014.

Cada un d'aquests dits s'uneix a un triplet i la diferència en la seqüència d'aminoàcids provoca que cadascun tingui una afinitat i especificitat diferents. Aquestes seqüències es poden modificar i optimitzar de manera que es puguin unir a diferents seqüències de DNA, fent possible poder dirigir la mutagènesi en qualsevol punt d'interès del genoma (Desjarlais i Berg, 1992; Chandrasegaran i Smith, 1999). Un sol *zinc-finger*

produirà el trencament en una sola cadena. Per incrementar les probabilitats de generar mutacions, es dissenyen les ZFN de manera que s'uneixin específicament en dues regions molt properes al lloc on es vol generar la mutació, deixant un espai d'uns 9 nucleòtids. En aquests 9 nucleòtids, anomenats *linker*, és on les nucleases *FokI* produiran el trencament de doble cadena (Kim et al, 1996; Chandrasegaran i Smith, 1999).

El trencament de doble cadena estimularà els mecanismes de reparació endògens de la cèl·lula que actuarà a través de dos mecanismes, la unió d'extremes no homòlegs (NHEJ) o per recombinació homòloga, també anomenat reparació dirigida per homologia (HDR) si hi ha un motlle de DNA present (Figura 20) (Liang et al, 2005). El mecanisme més freqüent és el NHEJ, en el qual es tracta d'unir de nou la doble cadena. Sovint els extrems ocasionats per l'acció de la nucleasa no són compatibles, de manera que la cèl·lula els modificarà eliminant i/o afegint nucleòtids a l'atzar per tornar-los a unir. D'aquesta manera, la seqüència reparada serà diferent a la seqüència inicial.



**Figura 20.** Mecanismes de reparació del DNA més freqüents. El mecanisme d'unió d'extremes no homòlegs (esquerre) insereix o elimina nucleòtids a l'atzar mentre que el de reparació dirigida per homologia inserirà la seqüència desitjada. Extret de Tsai i Joung, 2016.

La recombinació homòloga és un fenomen que es dona en molt baixa freqüència. No obstant, el trencament de la doble cadena incrementa les possibilitats que aquest es doni. Per afavorir aquest mecanisme de reparació enlloc del NHEJ, és necessari administrar la seqüència de DNA que es vol inserir. Tot i que l'eficiència de la recombinació homòloga és molt més baixa, és l'estratègia més útil quan es vol aconseguir una mutació determinada, per exemple, un *knock in*. L'objectiu d'aquestes tècniques no és només generar mutacions, sinó que aquestes es transmetin a través de la línia germinal. El grup de Carroll va ser el primer en demostrar que l'aplicació de les ZFN en animals resulta exitosa, tant per NHEJ com per recombinació homòloga (Bibikova et al, 2002; Bibikova et al, 2003). L'ús de ZFN en peix zebra ha demostrat una eficiència de transmissió superior al 25% de la descendència (Doyon et al, 2008;

Meng et al, 2008). Per la generació de mutants en peix zebra amb aquest mètode, s'injecta el mRNA que codifica per les ZFN en embrions en l'estadi d'una cèl·lula. Aquests animals mosaics fundadors es deixen créixer i es fa un *outcross* per obtenir la generació F1, en la qual s'identificaràn les mutacions induïdes. No obstant, existeix la possibilitat de *off-target* de les ZFN (Doyon et al, 2008; Meng et al, 2008). Tot i que no sempre es donen, és un inconvenient a tenir en compte.

El desenvolupament de les ZFN va ser, sense cap mena de dubte, un avenç molt important. No obstant, la probabilitat d'*off-targets*, l'alt cost, la dificultat de sintetitzar ZFN amb elevada eficiència i el temps que requereix, han fet que quedi en un segon pla gràcies al desenvolupament de les TALEN (transcription activator-like effector nucleases) (Miller et al, 2011). Les TALE són proteïnes d'unió a DNA presents en bacteris *Xanthomonas* utilitzades per regular l'expressió gènica de les plantes que infecten (Kay et al, 2007; Bogdanove et al, 2010). Estructuralment, les TALE consisteixen en unes 30 repeticions d'unitats formades per 33-35 aminoàcids, al centre de les quals hi ha present el domini de reconeixement del DNA (Figura 19B). Cada unitat reconeix un nucleòtid de manera específica. Aquesta especificitat ve donada pels aminoàcids en les posicions 12 i 13 anomenats diresidus variables de la repetició (RVD). Repeticions amb diferents RVD reconeixen diferents nucleòtids, de manera que utilitzant aquest codi es pot controlar el lloc d'unió al genoma (Boch et al, 2009; Moscou i Bogdanove, 2009). La fusió de les TALE amb el domini catalític de la nucleasa *FokI* constitueix el sistema TALEN. De la mateixa manera que les ZFN, genera trencaments de doble cadena al DNA que seran reparats pels mecanismes de NHEJ o recombinació homòloga i ja s'ha demostrat la seva aplicabilitat en cultius cel·lulars i en diferents organismes (Miller et al, 2011; Hockemeyer et al, 2011; Li et al, 2011; Liu et al, 2012), inclòs el peix zebra (Huang et al, 2011; Sander et al, 2011). Sorprenentment, en algú cas s'ha aconseguit generar mutacions bial·lèliques (Bedell et al, 2012). Les eficiències de transmissió a la línia germinal són semblants a les aconseguïdes amb ZFN, entre 10-33%. La optimització d'aquesta metodologia ha permès arribar a taxes de transmissió d'entre el 10 i el 100% i a generar delecions fins a 18kb, delecions cromosòmiques i inversions (Ma et al, 2013; Xiao et al, 2013). A més, permet la generació de *knock in* per recombinació homòloga tant a partir de DNA de cadena senzilla com de doble cadena (Bedell et al, 2012; Zu et al, 2013). Comparant l'eficiència de mutacions somàtiques, les TALEN resulten superiors respecte a les ZFN, entre un 20-76.8% contra 1.1-2.3%, respectivament (Moore et al, 2012).

Recentment s'ha descrit l'ús del sistema CRISPR/CRISPR-associated (Cas), present en bacteris i archaea, com l'eina d'edició genòmica més simple. El sistema CRISPR/Cas és un sistema de defensa bacterià que els protegeix davant infeccions víriques i DNA exògen. Es basa en la interacció del RNA CRISPR (crRNA) amb el crRNA transactivador (tracrRNA) que serveixen de guia a la nucleasa Cas9 pel trencament específic d'aquests DNAs invasors. El sistema CRISPR funciona de manera similar a la immunitat adaptativa dels vertebrats. En un locus específic del genoma bacterià, anomenat *CRISPR array*, hi ha presents repeticions d'entre 20-50 parells de bases separats per espaiadors de la mateixa mida anomenats *spacers*. S'ha identificat que aquests *spacers* provenen de genomes virals i plàsmids, servint com un record d'infeccions prèvies (Bolotin et al, 2005; Mojica et al, 2005). Sorprenentment, s'ha demostrat que la presència d'un *spacer* contra determinat virus protegeix al bacteri de la infecció del virus, mentre que la infecció per part d'un nou virus resulta en l'expansió del *CRISPR array* degut a l'addició de nous *spacer* derivats d'aquest virus (Barrangou et al, 2007).

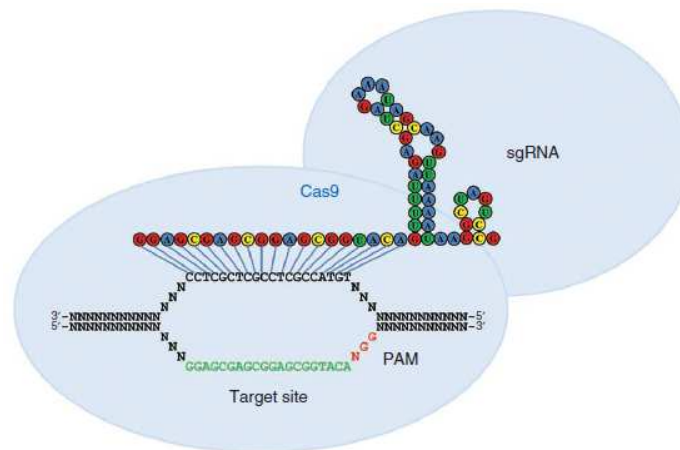
La immunitat mediada pel sistema CRISPR comprèn tres fases, adquisició del *spacer*, síntesi del crRNA i interferència (van der Oost et al, 2009; Makarova et al, 2011), i tots aquests processos són duts a terme per les proteïnes Cas. Els gens *cas* flanquegen els *CRISPR arrays*. Les proteïnes Cas es classifiquen en 6 tipus i addicionalment s'agrupen en dues classes (Makarova et al, 2011; Shmakov et al, 2015).

En el tipus I, la proteïna més important és la Cas3. En el tipus II, la proteïna efectora Cas9, necessària per la interferència. En el tipus III, la proteïna més important és la Cas10. En el tipus IV es troba la Csf1, encara no caracteritzada i no associada a cap *CRISPR array* (Makarova i Koonin, 2015). El tipus V comprèn nucleases similars a Cas9 com la Cpf1, C2c1 i C2c3 (Shmakov et al, 2015, Zetsche et al, 2015). Finalment, el tipus VI comprèn la C2c2 (Shmakov et al, 2015). Els tipus I, III i IV es consideren de classe I degut a que han de formar complexos amb diverses subunitats mentre que els tipus II, V i VI es consideren de classe II ja que una subunitat sola ja té capacitat efectora (Shmakov et al, 2015).

El primer sistema implementat per la generació de mutants és el tipus II. S'ha demostrat l'eficiència de la Cas9 a l'hora de generar mutacions en cultius cel·lulars en coexpressió amb els elements crRNA i tracrRNA (Cong et al, 2013). A més, s'ha dissenyat un RNA guia únic (*single guide RNA* o sgRNA), fruit de la fusió del crRNA i del tracrRNA, que també és capaç de dirigir efectivament la nucleasa Cas9 al seu



target (Figura 21), tant *in vitro* com *in vivo* en cèl·lules de mamífer (Jinek et al, 2012; Mali et al, 2013), bacteris (Jiang et al, 2013), llevat (DiCarlo et al, 2013), *Drosophila* (Gratz et al, 2013; Bassett et al, 2013), *C. elegans* (Friedland et al, 2013) i també en peix zebra (Chang et al, 2013; Hwang et al, 2013; Jao et al, 2013). L'avantatge d'aquests sistema respecte les ZFN i les TALEN, és que només es necessita un petit RNA (sgRNA) d'uns 100 nucleòtids dels quals 20 són complementaris al locus d'interés (habitualment escrit com N<sub>20</sub>-NGG, on la seqüència NGG corresponent al motiu adjacent al *protospacer*). El motiu adjacent al *protospacer* o PAM és essencial pel reconeixement per part de la nucleasa Cas9. Un altre avantatge d'aquest sistema és la possibilitat de coinjectar sgRNA contra diversos gens d'interés (*multiplex gene targeting*), una fita que encara no s'havia pogut aconseguir amb els mètodes anteriors (Cong et al, 2013; Shah et al, 2015).



**Figura 21.** Estructura del sistema CRISPR-Cas9. En verd s'indica la seqüència genòmica diana seguida per la seqüència PAM (vermell). El sgRNA presenta 20 nucleòtids complementaris al lloc diana necessaris per reclutar la endonucleasa Cas9 (blau). Extret de Hwang et al, 2013.

Donat el gran nombre de duplicacions gèniques que presenta el genoma del peix zebra, el sistema multiplex CRISPR/Cas esdevé una eina molt poderosa i útil que permet la inactivació simultània de gens duplicats. Efectivament, el grup de Chen ha millorat el sistema CRISPR/Cas utilitzant una Cas9 amb codons òptims per peix zebra i ha inactivat simultàniament 4 gens resultant en fenotips visibles en els mateixos individus F0, demostrant la gran eficiència mutagènica bial·lèlica (Jao et al, 2013). Recentment, han sortit treballs de generació de mutants a gran escala (83 gens, 162 locus) i demostren una eficiència de mutagènesi del 99% i una transmissió a la línia germinal mitjana de 28%, demostrant una major eficiència respecte les ZFN i les TALEN (Varshney et al, 2015). A més, també demostren la baixa probabilitat d'*off-targets* del sistema CRISPR/Cas. No obstant, aquesta elevada eficiència pot resultar letal en casos de gens vitals. Així, el grup de Giráldez ha desenvolupat una Cas9

fusionada al 3'UTR de *nanos1*, un gen que s'expressa en el primordi de les cèl·lules germinals (Köprunner et al, 2001; Mishima et al, 2006). D'aquesta manera s'incrementa dràsticament la taxa de mutagènesi en la línia germinal i es redueix la mutagènesi en cèl·lules somàtiques (Moreno-Mateos et al, 2015). Fins ara, el sistema CRISPR s'administrava injectant el sgRNA i el mRNA de la Cas9. Actualment, diversos laboratoris han aconseguit sintetitzar i purificar proteïna Cas9 i utilitzar-se de manera molt eficient per induir mutacions en el peix zebra (Burger et al, 2016). Recentment s'ha descobert que un altre sistema CRISPR/Cas, en aquest cas del tipus V, també té la capacitat d'induir talls en el DNA (Zetsche et al, 2015). A diferència de la Cas9, Cpf1 genera extrems amb 4 o 5 nucleòtids protuberants, el sgRNA no requereix de la seqüència corresponent al tracrRNA i requereix d'una PAM TTN a l'extrem 5' dels 20 nucleòtids complementaris (*protospacer*) (Zetsche et al, 2015), expandint encara més les possibilitats d'accedir a diferents parts del genoma.



**OBJECTIUS**



L'objectiu principal d'aquesta tesi és l'estudi dels canals de clorur de la família CLC utilitzant el peix zebra com a model. Per aconseguir aquesta meta, s'han plantejat els següents objectius:

1. Identificació del repertori de canals de clorur de membrana plasmàtica de la família CLC en el peix zebra.
2. Caracterització de l'expressió del mRNA dels canals *clc* en embrions i adults.
3. Generació i caracterització d'anticossos policlonals contra els canals *clc*.
4. Desenvolupament i caracterització d'animals model de *clc-1* en peix zebra.
  - a. Generació de vectors de transgènesi per l'expressió en múscul.
  - b. Generació de models de pèrdua de funció per *clc1a* i *clc1b*.
  - c. Caracterització del fenotip dels models de pèrdua de funció de *clc1a*, *clc1b* i *clc1a/b*.



# **MATERIALS I MÈTODES**





# 1. TÈCNIQUES DE BIOLOGIA MOLECULAR

## 1.1 OBTENCIÓ DE BACTERIS ELECTROCOMPETENTS I TRANSFORMACIÓ DEL DNA

Per obtenir una quantitat suficient de DNA per a realitzar diferents experiments necessitem poder-lo amplificar. Per això, partim d'un DNA plasmídic purificat que conté l'insert d'interès i un gen que confereix resistència a un antibiòtic. Aquest DNA purificat té capacitat autoreplicativa en cèl·lules bacterianes. Aquest procés s'anomena transformació. Normalment s'utilitzen soques bacterianes d'*Escherichia coli*. Quan s'han transformat els bacteris, es fan créixer en plaques amb LB-agar que contenen l'antibiòtic al que només presentaran resistència els bacteris que han incorporat el DNA exogen. En aquesta tesi s'han utilitzat les soques DH5α i DB3.1.

### 1.1.1 Obtenció de bacteris electrocompetents d'alta eficiència

L'electroporació és un mètode en què les soques d'*E.coli* són transformades a unes eficiències de l'ordre de  $10^9 \cdot 10^{10}$  transformants/ $\mu$ L.

- Materials i reactius

- Bacteris *E.coli* DH5α o DB3.1
- Medi LB
- Glicerol al 10% (v/v) en aigua i autoclavat. Utilitzar sempre a 4°C
- Tubs de centrifuga de 500 mL autoclavats. Refredats a 4°C

- Metodologia

Aquest protocol s'ha de realitzar en una campana de flux laminar o sota l'acció de la flama d'un *bunsen* per tal d'evitar contaminacions.

1. Raspar el glicerol de bacteris DH5α i s'inocula en 5 mL de LB sense antibiòtic. Incubar a 37°C en agitació durant tota la nit (12-16 hores).
2. Diluir el precultiu 1:100 (v/v) en 500 mL de LB i incubar a 37°C en agitació fins a arribar a una D.O.<sub>600</sub> de 0.5-0.7, moment en que els bacteris es troben en fase exponencial de creixement.
3. Aturar el creixement dels bacteris posant-los 20 minuts en gel. (**Nota:** a partir d'aquí, tots els passos s'han de realitzar a 4°C).
4. Transferir els bacteris als tubs de centrifuga de 500 mL (prèviament refredats) i centrifugar a 4.000 x g durant 15 minuts a 4°C.
5. Eliminar el sobrenedant per decantació. (**Nota:** eliminar tot el sobrenedant encara que es perdi una petita part dels bacteris).

6. Resuspendre el pellet en 500 mL de glicerol 10% (prèviament refredat) i es centrifugar a 4.000 x g durant 15 minuts a 4°C. Seguidament es decanta el sobrenedant.
7. Repetir els passos 5 i 6 dues vegades, pero aquest cop es resuspèn el pellet en un volum de 250 mL de glicerol 10%.
8. Després de decantar el sobrenedant, resuspendre el pellet en 2 mL de glicerol 10%.
9. Finalment, congelar els bacteris en nitrogen líquid en alíquotes de 50 µL.
10. Guardar a -80°C.

### 1.1.2 Transformació de bacteris

#### 1.1.2.1 Mètode d'electroporació

Aquest mètode de transformació de bacteris es basa en aplicar una descàrrega elèctrica que permeabilitza la paret bacteriana generant poros pels quals pot entrar DNA exogen. És necessari un cert grau de puresa del DNA a transformar per tal que estigui lliure de sals per aconseguir i així aconseguir una bona eficiència.

- Materials i reactius

- Bacteris *E.coli* DH5α o DB3.1
- Medi LB
- Cubeta d'electroporació de 0,1cm (BioRad)
- Electroporador (BioRad Micropulser)
- Plaques de Petri amb LB-agar que continguin l'antibiòtic al que presenti resistència el plasmid a electroporar

- Metodologia

1. Afegir 0.5-1 µL de plàsmid en una alíquota de 50 µL de bacteris electrocompetents. Mantenir-ho sempre en gel.
2. Homogenitzar la mostra i introduir-la entre els dos electrodes d'una cubeta d'electroporació refredada prèviament.
3. Introduir la cubeta en l'electroporador i aplicar una descàrrega elèctrica de 375 V mitjançant el programa per bacteris de l'electroporador "Ec1". L'aparell ens dona una valor en milisegons (*time constant*) que indica el temps en què la mostra ha estat sotmesa al xoc elèctric. Com més gran sigui el valor de temps, major quantitat de porus oberts en la paret cel·lular, fet que ajuda a millorar l'entrada de DNA exogen al bacteri. Utilitzem aquesta dada com a indicatiu de l'eficiència de transformació (**Nota:** considerar electroporació vàlida quan  $t > 4$  ms).
4. Recupera la mostra afegint 250 µL de LB sense antibiòtic i transferir a un tub nou.

5. Incubar la mostra a 37°C durant una 1h en agitació. Durant aquest temps es comença a expressar el gen de resistència que incorpora el plàsmid.
6. Sembrar 150-200 µL de bacteris en una placa de Petri que contingui LB-agar amb l'antibiòtic apropiat (**Nota:** el volum a sembrar pot variar. S'ha d'ajustar per tal d'aconseguir colònies aïllades).
7. Deixar assecar la placa uns minuts a temperatura ambient i incuba, en posició invertida, a 37°C tota la nit (12-16 hores). Cal fer sempre un control negatiu de transformació, en el que es sembren bacteris sense transformar.
8. Al dia següent, es piquen diverses colònies aïllades de la placa on s'havien sembrat el bacteris transformats. Es fan pre-cultius amb uns 4 mL de LB juntament amb l'antibiòtic adient. En la placa del control negatiu no ha d'haver-hi crescut cap colònia.
9. Incubar els pre-cultius a 37°C i en agitació durant tota la nit (12-16 hores) per realitzar posteriorment l'extracció del DNA.

## 1.2 OBTENCIÓ I PURIFICACIÓ DE PLÀSMIDS

Per obtenir el DNA amplificat a partir del procés de transformació s'ha utilitzat els kits comercials de *Qiagen (Qiagen Plasmid kit)*. Aquests kits permeten l'extracció i purificació de plàsmids provinents de cultius bacterians per el seu ús posterior. Hi ha diferents variants dels kits, depenent del volum de cultiu de DNA. En aquesta tesi s'han realitzat minipreparacions i midipreparacions. En el cas de les minipreparacions, es parteix d'un cultiu amb poc volum i s'obté una petita quantitat de DNA, mentre que en les midipreparacions es parteix d'un volum de cultiu major i, per tant, s'obté una quantitat de DNA més gran i d'una major puresa.

Aquests processos es basen en el mateix principi d'aïllament: lisi alcalina dels bacteris i posteriorment s'uneix el DNA a una resina d'intercanvi iònic. És essencial eliminar les impureses com el RNA, DNA cromosòmic, proteïnes, etc. Això s'aconsegueix mitjançant una sèrie de rentats de la resina amb una solució de salinitat mitja que conté etanol. Per acabar, s'elueix el DNA purificat amb aigua o amb un tampó de major salinitat.

### 1.2.1 Minipreparacions

L'objectiu és extreure petites quantitats de DNA (0.3-0.6 µg/µL) seguint les intruccions de l'equip comercial *Qiagen Plasmid Mini Kit*.

- Materials i reactius

- Pre-cultiu de 4 mL de medi LB que conté l'antibiòtic de selecció (12-16 hores a 37°C i en agitació)
- Tampó de resuspensió P1 (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA, 100 µg/mL RNAsa A i opcionalment LyseBlue 1X)
- Tampó de llisi P2 (200 mM NaOH, SDS 1%)
- Tampó de neutralització N3 (2.55 M acetat de potassi pH 4.8)
- Columnes d'intercanvi iònic (Qiagen)
- Tampó de rentat PE (200 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM EDTA (**Nota:** afegir el volum indicat d'etanol absolut al recipient))
- Aigua Milli-Q o tampó d'elució EB

- Metodologia

1. Centrifugar el precultiu a 4000 rpm durant 10 minuts a temperatura ambient i aspirar el sobrenedant amb l'ajuda del buit.
2. Resuspendre el pellet amb 250 µL de tampó P1 (**Nota:** el tampó P1 conté RNAsa, per tant s'ha de mantenir sempre en fred).
3. Afegir 250 µL de tampó P2 i barrejar per inversió (si s'ha afegit LyseBlue al tampó P1, l'homogenat es tornarà de color blau).
4. Afegir 350 µL de tampó N3 i barrejar per inversió (el llisat adquireix una consistència densa de color blanc).
5. Centrifugar 13000 rpm durant 10 minuts a temperatura ambient.
6. Transferir el sobrenedant a la columna que conté una resina d'intercanvi iònic i que està acoplada a un tub col·lector.
7. Centrifugar la columna durant 1 minut a 13000 rpm (el sobrenedant queda dipositat al tub col·lector i el DNA queda acoplat a la resina).
8. Descartar el sobrenedant.
9. Afegir 750 µL de tampó PE.
10. Centrifugar la columna durant 1 minut a 13000 rpm i descartar el sobrenedant
11. Sense afegir cap tampó, centrifugar la columna durant 1 minut a 13000 rpm (així s'eliminen les restes d'etanol que puguin quedar en la resina).
12. Acoplar la columna a un tub eppendorf nou i eluir el DNA afegint 50 µL del tampó EB o aigua Milli-Q (deixar reposar 1 minut per incrementar el rendiment de l'elució).
13. Centrifugar la columna durant 1 minut a 13000 rpm. En aquest cas, el DNA es trobarà dissolt en el tub eppendorf.
14. Quantificar la concentració del DNA extret (apartat 1.2.3) i guardar a -20°C.

### 1.2.2 Midipreparacions

L'objectiu és extreure grans quantitats de DNA (0.5-3 µg/µL) seguint les instruccions de l'equip comercial *Qiagen Plasmid Plus Midi Kit*.

- Materials i reactius

- Pre-cultiu de 50 mL de medi LB que conté l'antibiòtic de selecció (12-16 hores a 37°C i en agitació)
- Tampó de resuspensió P1 (50 mM Tris-HCl pH 7.5 10 mM EDTA, 100 µg/mL RNAsa A i opcionalment LyseBlue 1X)
- Tampó de llisi P2 (200 mM NaOH, SDS 1%)
- Tampó de neutralització S3 (2.55 M acetat de potassi pH 4.8)
- Filtre QIAfilter cartridge, èmbol i "Tube extender"
- Bomba de buit
- Tampó de captura BB
- Columnes d'intercanvi iònic (Qiagen)
- Tampó de rentat ETR
- Tampó de rentat PE (200 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM EDTA (**Nota:** afegir el volum indicat d'etanol absolut al recipient))
- Aigua Milli-Q o tampó d'elució EB

- Metodologia

1. Centrifugar el precultiu a 4000 rpm durant 20 minuts a temperatura ambient i aspirar el sobrenedant amb l'ajuda del buit.
2. Resuspendre el pellet amb 4 mL de tampó P1 (**Nota:** el tampó P1 conté RNAsa, per tant s'ha de mantenir sempre en fred).
3. Afegir 4 mL de tampó P2, barrejar per inversió (si s'ha afegit LyseBLue al tampó P1, l'homogenat es tornarà de color blau) i deixar incubar 3 minuts a temperatura ambient.
4. Afegir 4 mL de tampó S3 i barrejar per inversió (el llistat adquireix una consistència densa de color blanc).
5. Transferir el llistat al filtre QIAfilter Cartridge i deixar incubar 10 minuts..
6. Acoplar el filtre que conté al llistat a un tub nou de 50 mL.
7. Introduir l'èmbol per la part superior del filtre i fer pressió cap a l'interior. D'aquesta manera es filtra el llistat i aquest és recollit en el tub de 50 mL.
8. Afegir 2 mL de tampó BB i barrejar per inversió.
9. Acoplar un "Tube Extender" a la part superior de la columna.
10. Transferir el llistat a la columna a través del "Tube Extender".
11. Aplicar el buit per la part inferior de la columna

12. Rentar el DNA afegint 700 µL de tampó ETR i aplicar el buit
13. Rentar el DNA afegint 700 µL de tampó PE i aplicar el buit
14. Per eliminar les restes que hagin pogut quedar dels tampons anteriors, centrifugar la columna durant 1 minut a 9700 rpm.
15. Acoplar la columna a un tub eppendorf nou i eluir el DNA afegint 200 µL del tampó EB o aigua Milli-Q (deixar reposar 1 minut per incrementar el rendiment de l'elució).
16. Centrifugar la columna durant 1 minut a 9700 rpm
17. Quantificar la concentració del DNA extret (apartat 1.2.3) i guardar a -20°C.

### 1.2.3 Quantificació del DNA

Els àcids nucleics tenen un pic d'absorbància a una densitat òptica de 260 nm, fet que permet la seva quantificació i comprovació del grau de puresa. El DNA o RNA extrets es quantifiquen mitjançant un espectrofotòmetre, a una densitat òptica de 260 nm, realitzant un perfil d'absorbància entre 220 i 320 nm. El DNA i RNA purificats presenten una corba típica amb el seu màxim a 260 nm, punt que es mesura per extrapolar la concentració de la nostre mostra. Utilitzant tan sols 1 µL de mostra en l'espectrofotometre (NanoDrop), ens dona un valor d'absorbància a 260 nm, la qual correspon a 50 µg/mL de DNA o 40 µg/mL de RNA i automàticament calcula la concentració en µg/µL.

La fórmula a aplicar és la següent:

$$C = \text{ABS}_{260} \times 50 \mu\text{g} / 1000 \mu\text{L} \times \text{FD} \text{ (per DNA)}$$

$$C = \text{ABS}_{260} \times 40 \mu\text{g} / 1000 \mu\text{L} \times \text{FD} \text{ (per RNA)}$$

on C es la concentració, ABS és l'absorbància i FD és el factor de dilució.

Com a calibratge de la mesura, és necessari realitzar un "blanc" que contingui únicament el tampó utilitzat per eluir o resuspendre la mostra.

### 1.2.4 Sequenciació del DNA

El darrer pas per verificar el plàsmid obtingut és assegurar-se que la seqüència de nucleòtids és correcta. Per això, es procedeix a seqüenciar-lo. Existeixen diversos sistemes comercials basats en el mètode de Sanger (Sanger et al., 1977). El que s'ha utilitzat en aquesta Tesi és el sistema *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* i l'analitzador ABI3730 de la casa comercial Applied Biosystems.

- Materials i reactius
  - Termociclador (Applied Biosystems)
  - Seqüenciador ABI3730
  - BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit
  - Tampó de seqüenciació 5X (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit)
  - DNA d'interès
  - *Primer* 1  $\mu$ M

És recomanable generar diverses reaccions de seqüència en diferents regions per un mateix DNA per tal que es pugui "llegir" i comprobar que no hagi errors de seqüència en la nostre mostra.

- Metodologia
  1. Barrejar en un tub de PCR 200 ng de DNA, 1  $\mu$ L de *BigDye*, 1  $\mu$ L de tampó de seqüenciació, 3.2  $\mu$ L de *primer* i aigua Milli-Q fins a un volum final de 10  $\mu$ L (la *BigDye* és l'últim reactiu que s'afegeix).
  2. El programa per la PCR de seqüenciació és el següent (x25 cicles):
    - Desnaturalització a 96°C: 10 segons
    - Hibridació a 50°C: 5 segons
    - Elongació a 60°C: 4 minuts
  3. Finalitzada la reacció de PCR, afegir 10  $\mu$ L d'aigua Milli-Q i enviar als Serveis Científico-Tècnics del Parc Científic de Barcelona, on generaran la seqüència.

### 1.3 CLONATGE DE DNA EN UN PLÀSMID

Mitjançant tècniques de biologia molecular podem manipular i modificar fragments de DNA amb facilitat i si així ho desitgem, incloure'ls en un vector o plàsmid específics per dur a terme diferents experiments. La gran diversitat de vectors disponibles ens permeten des de la sobreexpressió d'un gen d'interès en bacteris o cèl·lules de mamífer, a vectors per fer assajos d'interacció entre proteïnes (com el doble híbrid), vectors per generar animals transgènics, etc. En aquesta tesi s'ha utilitzat la tècnica de clonació clàssica mitjançant l'ús d'enzims de restricció, la clonació per recombinació mitjançant el sistema *Gateway* (Invitrogen) i la clonació de mutants mitjançant la reacció de PCR recombinant.

#### 1.3.1 Reacció de PCR

La reacció en cadena de la polimerasa o PCR (*Polymerase Chain Reaction*) és un sistema *in vitro* que permet l'amplificació selectiva de fragments de DNA de doble



cadena de manera exponencial, utilitzant una polimerasa termostable i oligonucleòtids encebadors (*primers*) específics pel fragment de DNA a amplificar (Saiki et al., 1988). Consisteix en cicles successius de desnaturalització de la doble cadena del DNA, una posterior hibridació de les cadenes senzilles amb els *primers* (que posseeixen una seqüència complementària a la que es pretén amplificar) i finalment d'un pas anomenant extensió, en el qual la polimerasa "llegeix" la cadena senzilla i afegeix els nucleòtids complementaris, obtenint així de nou, DNA de doble.

A cada cicle, idealment es dobla el nombre de còpies del fragment de DNA, per tant, s'obté una amplificació exponencial a partir d'un nombre inicial baix de còpies. Cada fragment de DNA a amplificar presenta unes característiques diferents, per aquest motiu és convenient optimitzar les condicions per cada fragment en particular (ja sigui modificant el nombre de cicles o la temperatura d'hibridació).

El correcte disseny dels *primers* és un punt clau per obtenir una PCR eficient. Es recomana tenir en compte els següents factors per el òptim disseny:

- 1) El nombre de A+T, ha de ser similar al nombre de C+G.
- 2) La presència de C o G a l'extrem 3', ja que la unió C-G és molt estable i ajudarà a la polimerasa a iniciar el seu procés.
- 3) Evitar *primers* que puguin formar estructures internes estables a la temperatura a la que s'hagin d'utilitzar (habitualment al voltant de 55°C), o que presentin seqüències complementàries que permetin la formació de dímers.
- 4) L'extrem 5' ha de presentar una energia lliure de Gibbs molt negativa (per assegurar una unió forta) i l'extrem 3', menys negativa (per assegurar una unió específica ja que la desestabilització provocada per un nucleòtid no emparellat podria provocar la no unió del *primer*).

A continuació es mostra la PCR optimitzada en el laboratori utilitzant la *KOD Hot Start DNA Polymerase* (Novagen):

Tampó Polimerasa (10X)	5 µL
dNTPs (2 mM cadascún)	5 µL
MgSO <sub>4</sub> (25 mM)	3 µL
<i>Primer Fw</i> (10 µM)	1.5 µL
<i>Primer Rv</i> (10 µM)	1.5 µL
DNA (200 ng/µL)	X µL
KOD 1 U/µL)	1 µL
Aigua Milli-Q	Y µL
Volum final	<b>50 µL</b>

La reacció de PCR es fa en tubs de 0.2 o 0.5 mL (idealment autoclavats) i s'incuba en un termociclador amb un programa predeterminat. Quan es realitza una PCR per primera vegada cal optimitzar el procés variant els diferents paràmetres de la reacció. Les condicions estàndard per la *KOD Hot Start DNA polymerase* al laboratori són les següents:

Inici: 2 minuts a 95°C

Desnaturalització: 30 segons a 95°C

Hibridació: 30 segons a 45°C

Elongació: 1 minut i 30 segons a 70°C

} x25 cicles

Elongació final: 10 segons a 70°C

Finalment es deixa a 4-16°C

El temps d'elongació depèn de la longitud del fragment a amplificar (generalment 1 min/kb) i la temperatura d'hibridació depèn de la seqüència del *primer*, i es calcula en °C, mitjançant la següent fórmula:

$$T_m = [4 (G + C) + 2 (A + T)] - 4$$

En el cas que l'oligonucleòtid no sigui totalment complementari al DNA, la temperatura d'hibridació es redueix, amb la finalitat de facilitar una unió no totalment específica.

### 1.3.2 Reacció de PCR recombinant o mètode SOE (*splicing by overlap extension*)

Aquest tipus de PCR ens permet introduir mutacions puntuals al DNA, insercions i deleccions relativament llargues. La tècnica consisteix en generar independentment 2 fragments de PCR que continguin la mutació: una amb un *primer* Fw 5' i un *primer* Rv amb la mutació (PCR1) i una altra reacció que es generarà a partir d'un *primer* Fw amb la mutació i un *primer* Rv 3' (PCR2). Aquests dos fragments contenen una regió de solapament que és igual i que conté la mutació d'interès, això permet fer-los servir com a motlle per la següent PCR de recombinació (PCR3), utilitzant els *primers* Fw 5' i Rv 3' de les PCR1 i PCR2, respectivament.

(**Nota:** després de generar les PCR1 i PCR2, i abans de fer la PCR3, és necessari fer uns passos previs de comprovació dels fragments en gels d'agarosa i purificació d'aquests. Aquests passos estan explicats als apartats 1.3.3.2 i 1.3.3.3)

La PCR recombinant ha estat optimitzada al laboratori amb la *KOD Hot Start DNA polymerase* de la següent manera:

Tampó Polimerasa (10X)	10 µL
dNTPs (2 mM cadascún)	10 µL
MgSO <sub>4</sub> (25 mM)	6 µL
Primer Fw (10 µM)	3 µL
Primer Rv (10 µM)	3 µL
PCR1	5 µL
PCR2	5 µL
KOD 1 U/µL)	2 µL
Aigua Milli-Q	66 µL
Volum final	<b>100 µL</b>

El producte de la PCR recombinant es torna a verificar en un gel d'agarosa i es purifica la banda correcta, obtenint el fragment de DNA amb la mutació.

Finalment es procedeix a clonar el fragment en el vector d'interès ja sigui pel mètode clàssic o pel sistema *Gateway* (Sigma)

### 1.3.3 Clonació clàssica

El mètode clàssic de clonació permet introduir un gen d'interès (insert) en un vector determinat. Això s'aconsegueix mitjançant la digestió amb enzims de restricció tant del vector com de l'insert de manera que els seus extrems siguin compatibles (complementaris) i posteriorment es puguin unir mitjançant la reacció de lligació mediada per l'enzim lligasa.

#### 1.3.3.1 Digestió amb enzims de restricció

El clonatge amb enzims de restricció es basa en la característica que tenen aquestes endonucleases de tallar el DNA de manera seqüència específica generant extrems (cohesius o roms) que poden ser relligats en el vector d'interès. Les digestions de DNA s'han realitzat seguint les instruccions de la casa comercial utilitzada (New England Biolabs). Pel que fa als enzims, s'ha utilitzat de 1 a 10 U/µg de DNA, i mai sense superar el 10% del volum final de la reacció. Totes les digestions s'han efectuat a 37°C durant 2-16 hores, depenent de l'eficiència de la reacció de digestió i de la quantitat de DNA.

En alguns casos és necessari fer digestions dobles, que es poden fer alhora si els dos enzims són compatibles (és a dir, si mantenen una alta activitat en el mateix tampó i si no presenten *star-activity*). Si no ho són, cal efectuar primer una digestió, córrer la mostra en un gel d'agarosa, tallar la banda i purificar-la per realitzar la segona digestió posteriorment.

### 1.3.3.2 Electroforesis de DNA en gel d'agarosa

Per validar la integritat d'un DNA, la qualitat d'una digestió, comprovar els fragments generats per PCR i per a la purificació de DNA després d'un dels processos esmentats anteriorment, es realitza l'electroforesi en gels d'agarosa no desnaturalitzants de manera que els fragments separats siguin de DNA de doble cadena. La migració d'aquests fragments es inversament proporcional a la seva mida. Juntament amb el DNA d'estudi es carrega un marcador que conté DNA de diferents longituds conegudes que ens serviran com a referència per identificar les nostres mostres.

- Materials i reactius

- Cubeta d'electroforesi
- Font de corrent elèctrica
- TAE 50X (tampó Tris-acetat) (2 M Tris-base, 1 M àcid acètic, 50 mM EDTA). Es guarda a temperatura ambient i s'utilitza a 1X per a córrer el gel
- Tampó de càrrega 6X (40 mM EDTA, 0.1% SDS, 30% Ficol 400, 0.2% blau de bromofenol). Es guarda a -20°C i s'utilitza a 1X
- Gel d'agarosa: la concentració d'agarosa varia segons la mida del DNA a visualitzar
- Marcadors de pes molecular GeneRuler

- Metodologia

1. Les mostres de DNA es preparen amb el tampó de càrrega a una concentració final 1X.
2. Preparar el gel d'agarosa amb TAE 1X. Per dissoldre l'agarosa es porta a ebullició al microones fins que la solució es torni completament transparent. Deixar atemperar i afegir una gota de bromur d'etidi (amb 2 µL és suficient). Barrejar i abocar a la cubeta on prèviament s'ha posat una pinta.
3. Quan el gel ja ha polimeritzat, col·locar en la cubeta d'electroforesi, afegir TAE 1X fins que el gel quedi cobert, extreure la pinta i carregar les mostres juntament amb el marcador de pes molecular.

4. Aplicar camp elèctric a 100 V. El temps de migració dependrà de la mida del DNA i del % d'agarosa del gel. La migració es produirà des del pol negatiu al positiu ja que el DNA te càrrega negativa degut a la presència de grups fosfat.

4. Finalitzada la migració, visualitzar les bandes en un trans-il·luminador de llum ultravioleta i fer-ne una fotografia.

### 1.3.3.3 Purificació del DNA

Sovint es necessita purificar fragments de DNA digerits de plàsmids o PCRs per tal d'efectuar un clonatge. Per això, primer cal realitzar una electroforesi en gel d'agarosa, i a continuació aïllar la banda d'interès per després purificar-la. Per aconseguir una bona purificació s'ha de carregar una gran quantitat de DNA en el gel (normalment tota la digestió o tota la PCR), ja que una gran part del DNA es perd durant el procés de purificació.

La mostra es deixa migrar suficientment de manera que la banda d'interès estigui prou separada de la resta. Després es talla la banda amb un bisturí, sota la llum ultravioleta a baixa potencia i es diposita en un tub eppendorf.

La purificació del DNA es realitza amb el *kit* comercial *High pure PCR product purification kit* (Roche), que es basa en l'acció d'un agent caotròpic que desnatura proteïnes, dissol l'agarosa i promou la unió del DNA de doble cadena (en un rang 100 pb i 48 Kb) en una resina. El DNA unit a la resina es renta, eliminant possibles contaminants, i s'elueix amb el tampó que interressi.

#### • Materials i reactius

- Columnes acoplades a tubs col·lectors de 2 mL
- Tampó de captura o *binding* (3 M guanidina-tiocianat, 10mM Tris-HCl, 5% etanol (v/v), pH 6.6)
- Tampó de rentat (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl pH 7,5). (**Nota:** afegir el volum d'etanol indicat en l'ampolla)
- Aigua Milli-Q o tampó TE

#### • Metodologia

1. Afegir 500 µL/mg d'agarosa de tampó de captura i incubar a 60°C fins que l'agarosa es dissolgui completament (10-15 minuts).
2. Transferir la mostra a una columna acoplada a un tub col·lector i incubar durant 1 minut a temperatura ambient.
3. Centrifugar a 13000 rpm durant 1 minut a temperatura ambient i descartar el sobrenedant.

4. Afegir 500 µL de tampó de rentat i centrifugar a 13000 rpm durant 1 minut.
5. Efectuar un segon rentat de la columna amb 200 µL del mateix tampó de rentat i tornar a centrifugar a 13000 rpm durant 1 minut.
6. Eliminar el sobrenedant i transferir la columna a un tub eppendorf de 1,5 mL.
7. Eluir el DNA purificat amb 50 µL de tampó d'elució o aigua Milli-Q.

#### **1.3.3.4 Tractament del DNA amb fosfatasa alcalina**

La fosfatasa alcalina elimina els grups 5'-fosfat del vector de DNA digerit. D'aquesta manera el vector no es pot relligar augmentant l'eficiència de lligació amb l'insert, que té els seus propis grups 5'-fosfat lliures. S'ha utilitzat la fosfatasa alcalina de la casa comercial Roche.

Afegir 2 µL de fosfatasa alcalina a un volum total de 50 µL de vector digerit (barreja de vector digerit, enzims de restricció i tampó de digestió) i incubar la mostra durant 30 minuts a 37°C. Procedir amb una electroforesis i purificació del vector digerit i de l'insert de la mateixa manera que s'explica als apartats anteriors.

#### **1.3.3.5 Lligació**

El procés de lligació és el procés pel qual el vector (digerit, purificat i desfosforilat) i l'insert s'uneixen. La reacció de lligació es dona gràcies a l'enzim T4-DNA lligasa que catalitza la formació d'un enllaç fosfodièster entre l'extrem 5' fosfat i el 3' hidroxil en un DNA de doble cadena. Aquesta reacció finalment es transforma en bacteris competents i és convenient realitzar els següents controls:

- Control negatiu de lligació: transformació del vector digerit sense insert.
- Control positiu de transformació: transformació d'una construcció de DNA coneguda que funciona bé.
- Control negatiu de transformació: plaquejar bacteris no transformats.

Es considera que una lligació ha funcionat bé quan creixen moltes més colònies en la lligació problema que en el control negatiu de lligació, i cap en el control negatiu de transformació. L'èxit d'una lligació depèn de diversos factors que s'han de tenir en compte, com ara la qualitat i la quantitat del DNA utilitzat, la forma dels extrems que han generat els enzims de restricció (millor extrems cohesius que roms), la relació molar entre el vector i l'insert, el grau de fosforilació del vector i el mètode de transformació.

Habitualment, el procés de lligació s'efectua en un volum final de 10 µL i la relació vector:insert que s'utilitza es una relació molar 1:3. La reacció es deixa incubar a 4-

16°C durant 16 hores. La lligació es transforma en bacteris electrocompetents i es comprova per digestió i sequenciació.

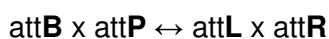
### 1.3.4 Clonació mitjançant el sistema *Gateway*

El sistema *Gateway* d'Invitrogen és un mètode de clonatge basat en el sistema de recombinació lloc específic del *fag lambda*. Aquest sistema proporciona una manera més ràpida i eficient de transferir una seqüència de DNA a diferents vectors comparat amb el sistema clàssic de clonatge mitjançant enzims de restricció degut a que evita els passos de digestió, purificació i lligació optimitzant el temps de clonatge. El sistema permet la transferència d'un insert d'un vector a un altre mitjançant la utilització d'un vector d'entrada, anomenat *Entry Clone*, capaç de recombinar amb tota una gamma de vectors destí, ja siguin d'expressió bacteriana, de mamífer, lentivirals, adenovirals, etc., com es representa de forma esquemàtica en la Figura .

#### 1.3.4.1 Clonatge mitjançant el sistema *Gateway* simple

El sistema *Gateway* està basat en el cicle biològic del *fag lambda* (Landy, 1989) i en el seu sistema de recombinació en *E.coli*. En el *fag lambda* la seqüència de recombinació és *attP* (243 pb), mentre que en *E.coli* es *attB* (25 pb). La reacció d'integració consisteix en la recombinació *attB* x *attP*, mitjançant proteïnes integrasa (Int) del *fag* i el factor d'integració de l'hoste (*Host Integration Factor*, HIF). El resultat d'aquesta reacció són dues noves seqüències de recombinació, *attL* i *attR*, flanquejant el profag recombinat, sense la pèrdua de seqüència de DNA. La reacció pot donar-se de forma inversa durant el procés d'escissió.

Quan *attL* i *attR* recombinen (reacció efectuada pel HIF i la proteïna fàgica Escisionasa (Xis)), el  $\lambda$ -DNA s'escindeix del genoma de *E.coli*, regenerant les seqüències *attB* (en *E.coli*) i *attP* (en el *fag*). Aquesta reacció es específica i bidireccional:



Seguint el protocol del proveïdor (Invitrogen), el primer pas és dissenyar els *primers* que permetin introduir les seqüències *attB1* i *attB2* als extrems del fragment de DNA d'interès a través d'una PCR. Una vegada s'aconsegueix flanquejar el fragment amb les seqüències *atts*, s'efectua la reacció de recombinació entre el fragment de PCR i un vector donador. Aquest vector donador (en el nostre cas **pDONR221**) conté les seqüències *attP1* i *attP2* i s'utilitza per clonar el producte de PCR que conté el gen d'interès flanquejat per *attB* i generar els clons d'entrada o *Entry Clones*. El pDONR conté el gen de resistència a kanamicina i el gen de selecció negativa *ccdB*, el qual

interfereix amb la DNA girasa de *E.coli* inhibint el creixement de la majoria de soques de *E.coli* (Bernard and Couturier, 1992).

Un *Entry Clone* (**pENTR**-gen d'interès), generat pel procés de recombinació entre el fragment de PCR i el vector donador (*attB* x *attP*), és un vector resistent a kanamicina, on el gen d'interès (flanquejat per seqüències *attL1* i *attL2*) ha eliminat el gen *ccdB*. Un cop obtingut el clon d'entrada, podem clonar el nostre insert a qualsevol vector destí (pDEST) que presenta resistència a ampicil·lina, conté el gen *ccdB* i presenta les seqüències de recombinació *attR1* i *attR2*.

La recombinació entre el pENTR i el pDEST (*attL* x *attR*) té com a resultat el vector d'expressió desitjat, que conté el nostre gen d'interès flanquejat per unes seqüències de recombinació *attB1* i *attB2* i presenta resistència a ampicil·lina.

#### 1.3.4.2 Reaccio *attB* x *attP*. Construcció de clons d'entrada (*Entry Clones*)

El primer pas per la construcció d'un *Entry Clone* consisteix en dissenyar les seqüències *attB* que flanquejaran el gen d'interès. Les seqüències dels *primers* utilitzats han sigut les següents:

Les quatre guanines (G) afegides a l'extrem 5' de cada oligonucleòtid augmenten l'eficiència de la recombinasa. S'introdueix la seqüència *attB1* i abans d'introduir el gen d'interès, s'afegeix la seqüència *Kozak* (ACC) abans del codó d'inici del gen (ATG) facilitant el reconeixement de la seqüència d'iniciació (AUG) durant el procés de traducció. Seguidament s'afegeixen entre 18 i 25 pb del gen d'interès. A la seqüència *attB2* s'afegeix un codó *stop* de la traducció del gen d'interès. La reacció de recombinació entre el gen d'interès flanquejat per *attBs* i el pDONR (flanquejat per *attPs*) es du a terme mitjançant l'enzim recombinasa **BP clonasa II**, obtenint l'*Entry Clone* (*attL1* i *attL2*).

En un tub eppendorf de 1.5 mL es preparen els següents reactius:

Producte de PCR- <i>attB</i>	(20-50 fmols) 3µL
pDONR (150 ng/µL)	1µL
BP clonase II	1µL

Incubar la reacció a 25°C entre 2-12 hores i aturar afegint 0.5 µL de de proteinasa K (proporcionada per Invitrogen) a 37°C durant 10 minuts. Finalment, transformar 0.5 µL de la reacció en bacteris DH5α per electroporació i plaquejar en plaques de LB-agar que contenen 50 µg/mL de kanamicina. Un cop extret el DNA, aquest es comprova per digestió i seqüenciació.



### 1.3.4.3 Reacció *attL* x *attR*. Construcció de vectors d'expressió

La recombinació entre un *Entry Clone*, que conté les seqüències *attL*, i el vector destí, amb seqüències *attR*, es fa mitjançant la **LR clonasa II**. En un tub eppendorf de 1.5 mL es preparen els següents reactius:

Vector Destí	150 ng
Entry clone	150 ng
Aigua Milli-Q	fins a 5 µL de volum final
LR clonasa II	1 µL

Incubar la reacció a 25°C entre 2-16 hores i aturar afegint 0.5 µL de proteinasa K durant 10 minuts a 37°C. Finalment, transformar 0.5 µL de la reacció en bacteris DH5α per electroporació d'igual forma que amb els *Entry Clones*. Plauejar en plaques de LB-agar que contenen ampicil·lina a 100 µg/mL. Els vectors resultants són comprovats per digestió i sequenciació.

### 1.3.4.4 Clonatge mitjançant el sistema *Gateway Multisite* de dos fragments

El sistema Gateway permet construir vectors d'expressió de manera ràpida i eficient a partir de 2, 3 o 4 fragments de DNA gràcies al sistema *Multisite*. Aquesta tecnologia utilitza la recombinació específica de lloc per clonar simultàniament varis fragments de DNA en l'ordre i orientació correctes. S'utilitza l'equip comercial *MultiSite Gateway® Pro 2.0 Kit for 2-fragment recombination* (Invitrogen). La diferència entre el sistema *Multisite* i el simple es troba en les seqüències *atts*. Si es vol clonar dos fragments, en un dels fragments de DNA s'introdueix, per PCR, les seqüències *attB1* i *attB5r* i en l'altre fragment les seqüències *attB5* i *attB2*. Aquests dos fragments de DNA es clonen en els seus vectors donadors pDONR221 P1-P5r i pDONR221 P5-P2 respectivament, per generar dos *Entry Clones* els quals es podran recombinar amb el vector destí d'interès (mitjançant l'enzim **LR clonasa II plus**) generant el vector d'expressió desitjat.

S'ha de tenir en compte que si es volen clonar 2 fragments de DNA, i aquests són 2 proteïnes, cal treure el codó *stop* en el primer fragment quan s'introdueixen les seqüències *attBs* per PCR. Si no es així, l'expressió es quedaria aturada i només s'expressaria una de les dues proteïnes.

La reacció de LR s'ha optimitzat amb les següents relacions:

Vector Destí	20 fmols
Entry clone 1	10 fmols
Entry clone 2	10 fmols
Aigua MilliQ	X µL (fins a 5 µL de volum final)
LR clonasa II plus	1 µL

Els fmols de DNA es converteixen en ng utilitzant la fórmula:

$$\text{ng} = (\text{x fmols}) (\text{N}) (660 \text{ fg} / \text{fmols}) (1 \text{ ng} / 10^6 \text{ fg})$$

on x es el número de fmols i N la mida del DNA en parells de bases (pb). Incubar la reacció a 25°C tota la nit i aturar afegint 0.5 µL de proteinasa K, a 37°C durant 10 minuts. Finalment, transformar 0.5 µL de la reacció en bacteris DH5α com en el sistema simple.

#### 1.3.4.5. Utilització del software *Vector NTI* per la construcció virtual de clons.

S'ha utilitzat el programa Vector NTI Advance, proporcionat per Invitrogen, pel disseny virtual de clons mitjançant el sistema Gateway. Aquest programa ofereix la possibilitat de dissenyar els mapes dels plàsmids, els oligonucleòtids que contenen les seqüències *att*, integrar virtualment fins a 4 inserts en un vector, guardar en una base de dades tots els mapes elaborats, predir restriccions, etc.

### 1.4 OBTENCIÓ DE RNA MISSATGER I RT-qPCR

#### 1.4.1 Obtenció de RNA missatger a partir de teixit i cultius cel·lulars

Per la correcta manipulació del RNA és necessari recórrer a tractaments especials, ja que és una molècula fàcilment degradable. Tant la manipulació com les solucions que s'utilitzen han d'estar lliures de la presència de RNAses. Per això, cal seguir algunes mesures quan s'hi treballa:

1. La manipulació s'ha d'efectuar amb guants, ja que les mans són una font molt important de RNAses.
2. El material de vidre ha d'estar tractat a 200°C durant un temps mínim de 4 hores.
3. El material de vidre i plàstic utilitzat han de ser autoclavats durant 20 minuts a 1 atmosfera de pressió, i ser manipulats sempre amb guants.
4. Els stocks dels reactius utilitzats han de ser lliures de RNAses.
5. Cal pesar els reactius directament sobre recipients lliures de RNAses. En cas que el

reactiu sigui susceptible a ser autoclavat, ha de ser diluït en aigua Milli-Q i posteriorment autoclavat. En cas que la mostra no es pugui autoclavar, s'ha de tractar amb aigua DEPC.

En el present treball, l'obtenció de RNA missatger (mRNA) s'ha fet a partir de teixit procedent de peix zebra (tant d'adults com embrions sencers), de ratolí i de cultius primaris d'astròcits.

- Materials i reactius

- TRIzol (Invitrogen) (**Nota:** manipular amb molta cura, és un reactiu altament corrosiu!)
- Cloroform
- Isopropanol
- EtOH 70% amb DEPC
- Aigua Milli-Q amb DEPC
- Xeringues de 1 mL
- Agulles per xeringues de 1 mL 25G
- Raspador per cèl·lules

- Metodologia

1. Afegir 1 mL de TRIzol a les mostres (**Nota:** si es parteix de teixit o d'embrions, es recomana afegir només 500 µL del reactiu i procedir amb la homogenització. Un cop homogenitzat, afegir els 500 µL restant. D'aquesta manera s'evita la extravassació del reactiu).
2. Homogenitzar amb la xeringa acoplada l'agulla de 25G si partim de teixit o rascar amb el raspador si partim d'un cultiu cel·lular.
3. Centrifugar durant 5 minuts a 12000 x g a 4°C.
4. Transferir el sobrenedant a un tub nou i afegir-hi 200 µL de cloroform. Barrejar per inversió i incubar durant 3 minuts a temperatura ambient.
5. Centrifugar durant 15 minuts a 12000 x g a 4°C.
6. En aquest moment tenim l'homogenat separat en tres fases: la fase superior (**fase aquosa**) de color transparent que conté el mRNA, una fase intermitja que conté el DNA i la fase inferior (o fase orgànica) on es troben les proteïnes i altres restes cel·lulars. En aquest cas només ens interessa aïllar el mRNA, per tant transferim la fase aquosa a un nou tub.
7. Precipitar el RNA afegint 500 µL d'isopropanol. Incubar durant 10 minuts a temperatura ambient

8. Centrifugar durant 10 minuts a 12000 x g a 4°C.
9. Descartar el sobrenedant i rentar el pellet afegint 1 mL d'etanol 70% amb DEPC.
10. centrifugar durant 5 minuts a 7500 x g a 4°C.
11. Descartar el sobrenedant i deixar assecar durant 10 minuts (deixar els tubs oberts a sobre la poïata). **Nota:** no deixar assecar durant molt de temps o després es poden tenir dificultats per dissoldre el RNA
12. Dissoldre el RNA en 50 µL d'aigua amb DEPC. Per millorar-ne la solubilitat es pot escalfar fins a 55°C durant 10 minuts. **Nota:** important mantenir el RNA sempre en gel un cop s'ha afegit l'aigua.
13. Quantificar la concentració de RNA (apartat 1.2.3) i guardar a -80°C.

#### 1.4.2 PCR de transcripció reversa i PCR quantitativa (qPCR)

Es pot estudiar l'expressió gènica a partir d'una variant de la senzilla PCR, combinant-la amb marcadors fluorescents, de manera que es pot monitoritzar a temps real l'abundància d'un mRNA específic. Aquesta tècnica es coneix com a PCR quantitativa (qPCR) o *real-time*.

No obstant, la qPCR requereix de DNA de doble cadena. Per això prèviament s'ha d'amplificar i obtenir DNA a partir de RNA com a motlle (DNA complementari o cDNA). Aquesta tècnica es coneix com a PCR de transcripció reversa (VanGuilder et al., 2008).

Per fer la transcripció reversa s'ha utilitzat el kit *SuperScript III First-Strand System for RT-PCR*.

- Materials i reactius
- Extracte de RNA
- dNTP mix a 10 µM cadascún
- *Primers (random hexamers 50 ng/µL)*
- Aigua Milli-Q amb DEPC
- Buffer RT 10X (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500mM KCl)
- MgCl<sub>2</sub> 25 mM
- DTT 0.1 M
- RNase OUT 40 U/µL
- SuperScript III RT 200 U/µL
- RNase H 2 U/µL

- Metodologia

1. Preparar la següent barreja:

0.5-1 µg RNA	X µL
dNTP mix 10mM	1 µL
<i>Random hexamers</i>	1 µL
Aigua Milli-Q amb DEPC	fins a 10 µL

2. Desnaturalitzar incubant durant 5 minuts a 65°C.

3. Refredar en gel almenys 1 minut.

4. Afegir al mateix tub:

Buffer RT 10X	2 µL
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	4 µL
DTT 0.1 M	2 µL
RNase OUT	1 µL
SuperScript III	1 µL

5. Incubar durant 10 minuts a temperatura ambient (moment en què s'hibridaran els *random hexamers* amb el RNA), seguidament incrementar la temperatura a 50°C durant 50 minuts (en els quals es sintetitzarà el cDNA) i finalment 5 minuts a 85°C (per aturar la reacció).

6. Refredar en gel almenys 1 minut.

7. Eliminar el RNA motlle afegint 1 µL de RNase H i incubant durant 20 minuts a 37°C.

8. Quantificar la concentració del DNA extret (apartat 1.2.3) i guardar a -20°C.

Els *primers* per fer les qPCR s'han dissenyat amb els programes Primer Express (Applied Biosystems) i QuantPrime. S'ha procedit de la següent manera:

- Materials i reactius

- SYBR Select Master Mix 2X (Applied Biosystems)
- *Primers* (preferiblement solapant dos exons)
- cDNA 500 ng/ µL
- Aigua Milli-Q
- Plaques de 48 pous, lliures de DNases i RNases (Applied Biosystems)
- Termociclador Step One

- Metodologia

1. Per 1 reacció, preparar les següents barreges:

- 1  $\mu\text{L}$  cDNA 500 ng/  $\mu\text{L}$  + 3  $\mu\text{L}$  aigua Milli-Q
- 5  $\mu\text{L}$  SYBR Select Master Mix 2X + 0.5  $\mu\text{L}$  *primer Fw* + 0.5 *primer Rv*

2. Tenir en compte que per fer els estudis d'expressió gènica es realitzen 3 rèpliques per cada mostra i sempre s'ha d'incloure almenys un gen com a control endogen i controls negatius per assegurar-se que no hi hagi contaminacions.

3. Les condicions en què es generen les qPCR són les següents:

- |                  |              |
|------------------|--------------|
| 10 minuts a 95°C | } X40 cicles |
| 15 segons a 95°C |              |
| 1 minut a 60°C   |              |

Seguidament, en el mateix programa del termociclador, es realitza una corba de *melting*:

- 1 minut a 60°C
- Incrementos de 0.3°C
- 15 segons a 95°C

4. Calcular l'expressió relativa amb el mètode Pfaffl (Pfaffl, 2001) o  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

## 1.5 EXTRACCIÓ DE DNA GENÒMIC

Quan es treballa amb models animals amb mutacions genètiques és imprescindible saber quin és el genotip dels nostres animals per una correcta interpretació dels resultats. Per això és necessària una petita mostra de DNA genòmic de cada animal per genotipar-los. La manera de procedir serà diferent si partim d'un tall de l'aleta caudal d'un peix adult (amb el *kit* comercial *NucleoSpin Tissue* de Macherey Nagel, apartat 1.5.1) o si partim d'embrions (apartat 1.5.2).

### 1.5.1 DNA a partir de l'aleta caudal (*fin* o *tail clip*)

- Materials i reactius

- Tricaina 0.3%
- Pinça d'histologia i de cirurgia
- Bisturí
- Tampó T1
- Proteinasa K proporcionada pel *kit* (dissoldre amb tampó PB tal com indica el recipient)
- Tampó B3

- Etanol 100%
- Tampó BW
- Tampó B5 (**Nota:** afegir el volum indicat d'etanol 100%)
- Tampó BE (Tris-HCl 5 mM pH 8.5)
- Columnes amb resina

- Metodologia

- La obtenció de les cues es fa de la següent manera: s'omplen dues caixes amb aigua del tanc de l'estabulari i en una d'elles s'afegeix tricaina 0.3%. A continuació, posar un animal en la caixa amb l'anestèsic i esperar que aquest faci el seu efecte. Quan l'animal no es mogui, agafar-lo amb cura amb unes pinces per la cua i posar-lo sobre una placa de Petri. Amb l'ajuda d'un bisturí, estendre l'aleta caudal i tallar-la, amb compte de no tocar la part més distal del tronc en contacte amb l'aleta, ja que això li causaria dolor i sagnaria. Posar la cua en un tub en gel. Transferir l'animal a l'altre caixa amb només aigua. Un cop comença a recuperar-se de l'anestèsia, transferir-lo a una nova caixa amb aigua i blau de metilè, per evitar infeccions. Rotular tant la caixa com el tub corresponent amb el número per una posterior identificació. Repetir el procés per tots els animals dels quals es vulgui extreure DNA.

1. Començar l'extracció de DNA genòmic afegint 180 µL de tampó T1 i 25 µL de proteinase K. Incubar a 56°C durant 4 hores (agitar els tubs de tant en tant).
2. Afegir 200 µL de tampó B3 i incubar a 70°C durant 10 minuts.
3. Afegir 210 µL d'etanol 100% i transferir tot el llisat a una columna.
4. Centrifugar a 11000 x g durant 1 minut.
5. Rentar la columna afegint 500 µL de tampó BW.
6. Centrifugar a 11000 x g durant 1 minut.
7. Rentar la columna afegint 600 µL de tampó B5.
8. Centrifugar a 11000 x g durant 1 minut.
9. Eluir afegint 50 µL de tampó EB i deixar 1 minut (**Nota:** per millorar l'eficiència d'elució, escalfar prèviament el tampó EB a 70°C).
10. Centrifugar a 11000 x g durant 1 minut.
11. Quantificar la concentració del DNA extret (apartat 1.2.3).

### 1.5.2 DNA a partir d'embrions

- Materials i reactius

- Tampó de lisi (KCl 3M, Tris 1M pH 8.0, Tween-20 20% en H<sub>2</sub>O Milli-Q)
- Proteinasa K 1mg/mL
- Tampó TE 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM en aigua Milli-Q)

- Metodologia

1. Congelar els embrions (*pool* o individualment) amb 20  $\mu\text{L}$  de medi d'embrions en tubs de PCR de 0.2 mL.
2. Un cop descongelats, afegir 50  $\mu\text{L}$  de tampó de lisi i incubar a 95°C durant 10 minuts.
3. A continuació, deixar refredar en gel.
4. Afegir 5  $\mu\text{L}$  de proteinase K i incubar a 55°C durant 4 hores.
5. Desnaturalitzar la proteinase K incubant a 95°C durant 10 minuts.
6. Resuspendre amb 425  $\mu\text{L}$  de TE 1X.

### 1.5.3 PCR de genotipat

Hi ha diferents mètodes que permeten realitzar el genotipat, però tots ells requereixen d'una PCR per amplificar la regió en la qual es troba la mutació. Al laboratori actualment utilitzem dos mètodes, segons si és una mutació puntual (*SNP TaqMan assay*, Applied Biosystems) o si es tracta de insercions/delecions (*High-resolution melting analysis*, Applied Biosystems).

#### 1.5.3.1 SNP TaqMan Assay

Aquest assaig permet identificar de manera ràpida els individus que contenen la mutació puntual d'estudi. Per això, amb els *primers* per fer la PCR s'hi afegeixen dues sondes (cadascuna conjugada a un fluorocrom diferent) específiques per cada un dels al·lels. Aquest mètode és una aplicació més de la qPCR, ja que al mateix moment monitoritza la fluorescència (= amplificació) de cada al·lel. Finalment, el mateix *software* utilitzat per aquestes PCR analitza les fluorescències i genera uns gràfics i taules on s'indica el genotip de cada animal.

- Materials i reactius

- sondes específiques pel gen d'estudi 40X
- TaqMan Universal Master Mix II, no UNG 2X (Applied Biosystems)
- Plaques de 48 pous lliures de DNasa i RNasa
- Termociclador Step One

- Metodologia

1. Per 1 reacció:

100-200 ng de DNA genòmic	X $\mu\text{L}$
Sonda 40X	0.4 $\mu\text{L}$
TaqMan Master Mix 2X	8 $\mu\text{L}$



Aigua Milli-Q

fins a **16** µL

3. Aplicar el següent programa de PCR:

2 minuts a 50°C	
10 minuts a 95°C	
15 segons a 92°C	} X40 cicles
1 minut a 60°C	

Després dels 40 cicles: 30 segons a 60°C

### 1.5.3.2 *High-resolution melting analyses (HRM)*

Aquest assaig consisteix en fer una qPCR seguida d'una corba de *melting* (seqüencialment, després de la PCR). Com s'ha explicat anteriorment, el Syber Green emet fluorescència quan està unit a DNA de doble cadena, fet que ocorre durant la PCR. Si la temperatura augmenta fins a arribar a la  $T_m$  o temperatura de desnaturalització (específica per cada amplicó ja que depèn de la seva composició), la doble cadena deshidridarà i, per tant, es perdrà la fluorescència. Si aquest augment de temperatura es fa de manera gradual (+1°C/segon) es pot mesurar com és aquesta caiguda de fluorescència fins a obtenir un perfil per cada amplicó. D'aquesta manera es pot discriminar fàcilment entre animals homozigots i heterozigots, la corba dels quals presentarà un esglaó (degut a la inestabilitat dels heterodúplexs formats durant la PCR). Aquest és el principi de la HRM (Gundry et al, 2003; Wittwer et al, 2003).

- Materials i reactius

- primers 10 µM
- SYBR Select Master Mix 2X
- Plaques de 48 pous, lliures de DNases i RNases (Applied Biosystems)
- Termociclador Step One

- Metodologia

1. Per 1 reacció:

100-200 ng de DNA genòmic	X µL
SYBR Select Master Mix 2X	10 µL
<i>primer</i> Fw 10 µM	1 µL
<i>primer</i> Rv 10 µM	1 µL
Aigua Milli-Q	fins a <b>20</b> µL

2. Aplicar el següent programa de PCR:

10 minuts a 95°C  
 15 segons a 95°C } X40 cicles  
 1 minut a 60°C

Seguidament, en el mateix programa del termociclador, es realitza una corba de *melting*:

15 segons a 95°C  
 1 minut a 60°C  
 Incrementos de 0.2°C  
 15 segons a 95°C

## 1.6 SÍNTESI DE RNA *IN VITRO*

### 1.6.1 Síntesi de RNA amb caputxó (*capped* RNA)

En aquesta tesi s'han fet injeccions de RNA en peix zebra per realitzar diferents tipus d'experiments. Per això ha estat clau l'ús de diferents *kits* que permeten fer transcripció *in vitro* a partir d'un motlle de DNA. En aquest apartat s'explica com realitzar la síntesi de *capped* RNA, que mimetitzava les propietats del mRNA i permet ser traduït a proteïna. S'han utilitzat els kits *mMessage Machine SP6/T7 Transcription kit* (Ambion) per la síntesi de Cas9 i Tol2000.

- Materials i reactius

- DNA o plàsmid linial
- Tampó de reacció 10X
- NTP/CAP mix 2X
- RNA polimerasa SP6 o T7
- Aigua lliure de DNasa i RNasa (o aigua Milli-Q tractada amb DEPC)
- TURBO DNasa 2 U/ µL
- Solució de precipitació de clorur de liti (LiCl 7.5 M, EDTA 50 mM)
- Etanol 70% amb DEPC

- Metodologia

**Nota:** sempre portar guants i a ser possible, utilitzar puntes amb filtre

1. Fer la següent barreja:

DNA o plàsmid linial	3 µL
Tampó de reacció 10X	1 µL
NTP/CAP 2X	5 µL

RNA polimerasa SP6 o T7	1 µL
-------------------------	------

2. Incubar a 37°C durant 2 hores.
3. Afegir 1 µL de TURBO DNasa i incubar a 37°C durant 20 minuts.
4. Precipitar el RNA afegint:

LiCl	30 µL
Aigua DEPC	40 µL

5. Incubar a -20°C durant 16 hores.
6. Centrifugar a màxima velocitat a 4°C durant 30 minuts.
7. Descartar el sobrenedant, amb compte de no tocar el *pellet*.
8. Rentar afegint 200 µL d'etanol 70% amb DEPC.
9. Centrifugar a màxima velocitat a 4°C durant 15 minuts.
10. Descartar el sobrenedant i deixar assecar uns 15 minuts (**Nota:** igual que en l'extracció de RNA, no deixar passar molt de temps).
11. Resuspendre en 10-20 µL d'aigua (**Nota:** ràpidament posar en gel).
12. Quantificar la concentració de RNA.
13. Córrer 500 ng de RNA en un gel d'agarosa 1% per comprovar la integritat del RNA (**Nota:** no cal que sigui en condicions desnaturalitzants).

### 1.6.2 Síntesi de sondes de RNA

Per la síntesi de sondes de RNA s'ha utilitzat el *kit DIG RNA Labeling Kit* (Sigma).

- Materials i reactius

- DNA o plàsmid linial
- Tampó de reacció 10X
- Mix de dNTP (UTP està marcat amb digoxigenina) (Roche)
- Inhibidor de RNases RNasin
- RNA polimerasa SP6 o T7
- Aigua lliure de DNasa i RNasa (o aigua Milli-Q tractada amb DEPC)
- Etanol 70% amb DEPC
- Solució de precipitació de clorur de liti (LiCl 7.5 M, EDTA 50mM)

- Metodologia

1. Fer la següent barreja:

500 ng DNA o plàsmid linial	X $\mu$ L
Tampó de reacció 10X	2 $\mu$ L
Barreja de dNTP marcats	1 $\mu$ L
RNasin	1 $\mu$ L
RNA polimerasa SP6 o T7	1 $\mu$ L
Aigua DEPC	fins a <b>20</b> $\mu$ L

2. Incubar a 37°C durant 2 hores.

3. Precipitar el RNA afegint:

LiCl	30 $\mu$ L
Aigua	10 $\mu$ L

4. Incubar a -20°C durant 16 hores.

5. Centrifugar a màxima velocitat a 4°C durant 30 minuts.

6. Descartar el sobrenedant, amb compte de no tocar el *pellet*.

7. Rentar afegint 150  $\mu$ L d'etanol 70% amb DEPC.

8. Centrifugar a màxima velocitat a 4°C durant 15 minuts.

9. Descartar el sobrenedant i deixar assecar uns 15 minuts (**Nota:** igual que en l'extracció de RNA, no deixar passar molt de temps).

10. Resuspendre en 10-20  $\mu$ L d'aigua (**Nota:** ràpidament posar en gel).

11. Quantificar la concentració de RNA.

12. Córrer 500 ng de RNA en un gel d'agarosa 1% per comprovar la integritat del RNA (**Nota:** no cal que sigui en condicions desnaturalitzants).

### 1.6.3 Síntesi de RNA guia (gRNA)

La síntesi del gRNA es va fer amb el *kit MEGAshortscript T7 Transcription Kit* (Ambion). En aquesta tesi s'ha realitzat la síntesi de gRNA seguint dues estratègies diferents, una en la qual és necessari clonar el gRNA en el vector pDR274 (AddGene #42250) o una en la qual no cal clonar. A continuació s'expliquen les dues opcions.

#### 1.6.3.1 Síntesi de gRNA a partir del seu clonatge en el vector pDR274

- Materials i reactius
  - Plàsmid linial que contingui el gRNA (vector pDR274)
  - Tampó de reacció 10X
  - Solució d'ATP, CTP, GTP i UTP (per separat, 75mM cadascún)
  - TURBO DNasa 2U/  $\mu$ L

- Solució Stop d'acetat d'amoni (5 M  $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$ , 100 mM EDTA )
- Aigua lliure de DNasa i RNasa (o aigua Milli-Q tractada amb DEPC)
- Etanol 70% amb DEPC
- Etanol 100%
- RNA polimerasa T7

• Metodologia

1. Fer la següent barreja:

Tampó de reacció 10X	2 $\mu\text{L}$
ATP	2 $\mu\text{L}$
CTP	2 $\mu\text{L}$
GTP	2 $\mu\text{L}$
UTP	2 $\mu\text{L}$
DNA	4 $\mu\text{L}$
RNA polimerasa T7	2 $\mu\text{L}$
Aigua	4 $\mu\text{L}$

2. Incubar a 37°C durant 4 hores.
3. Afegir 1  $\mu\text{L}$  de TURBO DNasa i incubar a 37°C durant 15 minuts.
4. Afegir 115  $\mu\text{L}$  d'aigua a la reacció i 15  $\mu\text{L}$  de la solució Stop d'acetat d'amoni.
5. Barrejar i precipitar afegint 300  $\mu\text{L}$  d'etanol 100%.
6. Congelar a -20°C durant com a mínim 30 minuts (**Nota:** s'aconsella deixar-ho 16 hores).
7. Centrifugar a 14000 x g a 4°C durant 30 minuts.
8. Descartar el sobrenedant amb compte de no tocar el *pellet*.
9. Rentar el *pellet* afegint 800  $\mu\text{L}$  d'etanol 70% amb DEPC.
10. Centrifugar a 14000 x g a 4°C durant 30 minuts.
11. Descartar el sobrenedant.
12. Deixar evaporar les restes d'etanol a temperatura ambient.
13. Resuspendre el RNA en 10-20  $\mu\text{L}$  d'aigua.
14. Quantificar la concentració de RNA.
15. Córrer 500 ng de RNA en un gel d'agarosa 2-2.5% per comprovar la integritat del RNA (**Nota:** no cal que sigui en condicions desnaturalitzants).

### 1.6.3.2 Síntesi de gRNA sense clonar

La síntesi de gRNA sense necessitat de clonar-lo en cap vector, s'ha fet seguint el protocol descrit en Varshney et al, 2015.

- Materials i reactius

- Oligo 1, que conté el promotor (T7, en negreta), la seqüència del gRNA (20 nucleòtids) i 20 nucleòtids complementaris a l'oligo 2:

5' **TAATACGACTCACTATA**(N)<sub>20</sub>GTTTTAGAGCTAGAAATAGC 3'

- Oligo 2, que conté la seqüència crRNA i tracrRNA:

5' AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTT  
AACTTGCTATTTTCATGCTCTAAAAC 3'

- Polimerasa Phusion (New England Biolabs)

- Metodologia

1. Ensamblar els oligos:

Tampó de reacció 5X	5 µL
dNTP mix 10 mN	0.5 µL
Oligo 1 10 µM	1 µL
Oligo 2 10 µM	1 µL
Polimerase Phusion	0.5 µL
Aigua	17 µL

2. Aplicar les següents condicions en un termociclador:

Desnaturalització a 98°C, 2 minuts

*Annealing* a 50°C, 10 minuts

Extensió a 72°C, 10 minuts

3. Seguidament, carregar 5 µL en un gel d'agarosa al 2.5% per observar una banda de 120 bp aproximadament.

4. Si les bandes són correctes, procedir amb la síntesi de gRNA de l'apartat 1.6.3.1.

## 2. TÈCNiques DE BIOLOGIA DE PROTEÏNES

### 2.1 OBTENCIÓ DE PROTEÏNA TOTAL

#### 2.1.1 Obtenció de la proteïna total a partir de cèl·lules i teixit

Per tal de poder realitzar una correcta anàlisi de les proteïnes d'interès, en algú dels experiments d'aquesta tesi s'han hagut d'obtenir proteïna i posteriorment quantificar-la degudament.

- Materials i reactius

- PBS 1X

- Tampó de lisi : PBS 1X, Tritó X-100 1%, inhibidors de proteases (Aprotinina i PMSF a 1mM, Leupeptina i Pepstatina a 2µM) i NaCl 150mM

- Metodologia

La solubilització de proteïnes pot fer-se en condicions desnaturalitzants, amb detergents iònics com per exemple el SDS, que trenquen unions covalents, o bé poden fer-se en condicions no desnaturalitzants amb detergents no iònics com el Tritó X-100, Tween-20, digitonina, etc., que són capaços de mantenir diferents unions no covalents.

La **solubilització d'extractes cel·lulars** es fa en fred per evitar la desnaturalització de les proteïnes.

1. Rentar les cèl·lules 2 cops amb PBS 1X per eliminar l'excés del medi de cultiu i s'hi afegeixi a sobre el tampó de lisi (a 4°C, en gel). El volum de tampó de lisi utilitzat varia en funció del número de cèl·lules que hi ha, el qual depèn de la superfície o del diàmetre de la placa de cultiu on han sigut cultivades. Així, les cèl·lules procedents d'una placa de 100 mm de diàmetre són llisades amb 0.8-1 mL de tampó de lisi. En canvi, cèl·lules cultivades en un pou d'una placa multipou de 6 pous són llisades amb 100-120 µL de tampó. Es raspa les cèl·lules mitjançant un raspador. Es resuspenen bé amb l'ajut d'una pipeta i es transfereixen a un tub eppendorf (**Nota:** si l'extracte és de cèl·lules HEK293 saltar-se els rentats. Aquesta línia cel·lular no té bona adherència al plàstic de les plaques de cultiu i perdríem gran part del cultiu amb els rentats).

2. Incubar la mostra durant 1 hora a 4°C en agitació orbital.

3. Centrifugar el llisat a 13000 rpm durant 10 minuts a 4°C i transferir el sobrenedant a nou eppendorf.

4. Valorar la concentració de proteïna (apartat 2.1.3).

La **solubilització de teixit** i embrions (per extracte de múscul esquelètic veure apartat 2.1.2) s'ha fet de la manera següent:

- Materials i reactius

- Tampó de lisi : PBS 1X, HEPES 25mM, EDTA 4mM, sacarosa 250mM, Tritó X-100 1% i inhibidors de proteases (Aprotinina i PMSF a 1 mM, Leupeptina i Pepstatina a 2  $\mu$ M)

- Homogenitzador

- Xeringues de 1mL

- Agulles per xeringues de 1 mL 25G

- Metodologia

1. Afegir el volum de tampó de llisi aproximadament 3 vegades el pes del teixit.

2. Homogenitzar mitjançant un homogenitzador.

3. Per disgregar completament el teixit, passar el llisat varies vegades per una xeringa de 1 mL acoplada a una agulla de 25G. Si és necessari, utilitzar agulles de diàmetre més gran o petit segons la necessitat.

4. Un cop s'obté l'homogenat, procedir a partir del pas 2 del protocol anterior, solubilització d'extractes cel·lulars.

### **2.1.2 Obtenció d'extractes enriquits en proteïnes de membrana a partir de teixit**

Aquesta tesi està centrada en les proteïnes de membrana de la família CIC, les quals són poc abundants. Per això en alguns casos en els quals es vol estudiar els nivells d'aquestes proteïnes en un teixit, com els clc-1 del múscul esquelètic, s'ha procedit a fer un extracte només de proteïnes de membrana, de manera que aquestes proteïnes es trobaran enriquides en l'extracte final i serà més fàcil el seu estudi.

- Materials i reactius

- Tampó de lisi: Tris-HCl 20 mM, sacarosa 250 mM, EDTA 1 mM, inhibidors de proteases (Aprotinina i PMSF a 1 mM, Leupeptina i Pepstatina a 2  $\mu$ M), en aigua Milli-Q, pH 7.4

- Solució per aïllar membranes de múscul esquelètic: KCl 3 M

- Politró PT1600E: 15-25

- Teixit

- Tubs d'ultracentrífuga, rotor i ultracentrífuga

- Xeringues de 1mL

- Agulles per xeringues de 1 mL 23G i 30G

- Materials i reactius



1. Afegir el tampó de lisi al teixit (sempre en fred!). El volum de tampó depèn de la relació 8 mL de tampó/gram de teixit.
2. Homogenitzar el teixit amb el polítró. Fer 2 intervals de 30 segons a màxima potència.
3. Centrifugar l'homogenat a 4000 x g durant 10 minuts a 4°C.

Per fer un extracte total de múscul, passar directament al pas 8.

Per continuar amb l'extracte de membranes, seguir amb el pas 4.

4. Transferir el sobrenedant a un tub eppendorf de 1.5 mL *safe-lock* (**Nota:** important que el tub sigui *safe-lock*, d'altra banda es còrrer el risc que aquest es trenqui al posar-lo a la ultracentrífuga).
5. Incubar el sobrenedant amb KCl 0.6 M durant 1 hora a 4°C, en agitació orbital.
6. Centrifugar a 100000 x g durant 1 hora i 30 minuts a 4°C (s'utilitza el rotor 70Ti de Beckman Coulter).
7. Descartar tot el sobrenedant amb cura, i resuspendre el *pellet* amb tampó de lisi seguint la relació 0.8 mL/gram de teixit. Per una bona resuspensió, utilitzar seqüencialment agulles de 23G i 30G fins que quedi completament homogeni.
8. Finalment, valorar la concentració proteica pel mètode Bradford, aliquotar i congelar a -80°C.

### 2.1.3 Determinació de la concentració proteica

Després de l'extracció o la purificació de proteïnes és necessari conèixer la seva concentració, no només per evaluar el rendiment de l'extracció, sinó també per establir una correcte anàlisi dels experiments efectuats amb aquestes proteïnes. Els mètodes de valoració de la concentració de proteïnes utilitzats ens aquest treball han estat el mètode de Bradford i el mètode de BCA.

#### 1) Mètode de Bradford

Aquest mètode es basa en la propietat del colorant Coomassie blau brillant G-250 d'unir-se a les proteïnes, desplaçant el seu màxim d'absorció de 465 a 595 nm. L'absorció de la mostra a 595 nm serveix com a magnitud de mesura per la concentració de proteïnes. El colorant posseeix afinitat amb els aminoàcids bàsics i aromàtics. Aquest mètode és incompatible amb mostres que continguin detergents, ja que pot donar valors erronis.

- Materials i reactius

- Placa ELISA 96 pous
- Lector ELISA (Biotek)
- Reactiu Bradford. Solució comercial *BioRad Protein Assay* (Coomassie blau brillant G-250, àcid fosfòric i metanol), diluïda 1/5 en aigua destil·lada filtrada
- Solució de BSA (albúmina sèrica bovina) a 2 mg/mL en aigua Milli-Q

- Metodologia

1. Preparar la quantitat necessària de reactiu Bradford (diluït 1/5 en aigua destil·lada), tenint en compte que es necessiten 200 µL per cada pou i que per cada punt, tant de la recta patró com de cada mostra, s'han de realitzar duplicats.
2. En els primers pous de la placa ELISA, preparar els punts necessaris per fer la recta patró amb una proteïna de contracció coneguda, utilitzant un stock de BSA a 2 mg/mL (2 rèpliques per punt). La recta patró es genera amb 0, 0.5, 1, 2 i 5 mg de BSA en un volum final de 10 µL. En els següents pous, preparar 2 rèpliques d'entre 1 i 5 µL de cada mostra en un volum final de 10 µL.
3. Afegir 200 µL de reactiu Bradford diluït. Posteriorment, agitar la placa i mesurar en un lector d'ELISA a una absorbància de 595 nm.

## 2) Mètode de BCA

És convenient valorar les mostres solubilitzades amb detergent pel mètode de l'àcid bicinconínic (BCA) (*Protein Assay Reagent*, 23225), el qual s'ha realitzat seguint les especificacions del fabricant (Pierce). Aquest mètode es basa en la propietat que tenen els enllaços peptídics en solució alcalina de reduir el  $\text{Cu}^{2+}$ . Els ions  $\text{Cu}^+$  produïts s'uneixen a dues molècules de BCA produint un canvi en l'estructura electrònica de la molècula, fet que provoca que absorbeixi llum a 562 nm formant un compost de color porpra. En les condicions de la reacció, l'absorció del compost és proporcional a la concentració de proteïna present. No són compatibles amb aquest mètode mostres que continguin més de EDTA 100 mM, DTT 1 mM o  $\text{NH}_3\text{SO}_4$  20%.

- Materials i reactius

- Placa ELISA de 96 pous
- Lector ELISA (Biotek)
- Solució comercial (Pierce): Reactiu A (BCA, en condicions alcalines) i Reactiu B (4% de sulfat de coure). La barreja s'efectua a una relació de 50 mL de reactiu A per cada mL de reactiu B.

- Solució *stock* d'albumina bovina (BSA) a 2 mg/mL en tampó fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM) pH 7.4, conservada a temperatura ambient.

- Metodologia

El mètode es realitza de manera similar al mètode de Bradford. Es fa la recta patró per duplicat (0, 0.5, 1, 2 i 5 mg) igual que les mostres i es porta a volum final de 10  $\mu\text{L}$  amb aigua Milli-Q. S'afegeixen 200  $\mu\text{L}$  per pou del reactiu de BCA comercial (Pierce). En aquest cas, s'ha de deixar reaccionar el reactiu amb les mostres durant 15-20 min a 37°C. Finalment, es procedeix a la lectura mitjançant el lector d'ELISA a 595 nm.

## 2.2 ASSAIG DE WESTERN-BLOT

El Western-Blot és una tècnica àmpliament utilitzada en biologia molecular, ja que permet detectar de manera específica proteïnes a partir de mostres biològiques. Aquesta tècnica aporta informació sobre la mida de les proteïnes, així com de moltes característiques bioquímiques (oligomerització, fosforilació, glicosilació i altres característiques que influeixen en la migració electroforètica).

El procés es realitza seguint diferents etapes:

1. Electroforesi SDS-PAGE
2. Transferència
3. Immunodetecció

### 1) Electroforesi SDS-PAGE

L'electroforesi en gels desnaturalitzadors d'acrilamida-SDS és un sistema clàssic que s'utilitza per separar proteïnes en funció del seu pes molecular. El mètode es basa en que les proteïnes contingudes en una solució de SDS (detergent aniónic) són capaces de migrar sota un camp elèctric. L'SDS dóna a les proteïnes càrrega negativa, mantenint la relació càrrega/massa, que permet la seva migració sobre una malla de polímer (acrilamida/ bisacrilamida) en aplicar un camp elèctric.

El gel de poliacrilamida consta de dues parts: un gel concentrador (*stacking*) que permet alinear les proteïnes prèviament a la separació electroforètica, i un gel separador (*running*).

La concentració d'acrilamida/bisacrilamida del gel separador varia segons el pes de la proteïna a detectar. Així, la separació de proteïnes amb un pes molecular menor serà més eficient en gels més concentrats i viceversa.

Juntament amb la mostra problema, es fan migrar estàndards de pes molecular conegut i pretenyits com a marcadors per conèixer la mida de la proteïna problema.

- Materials i reactius

- Extractes de proteïna total o de membrana en un tampó de càrrega
- Sistema de Western-Blot *Mini-Protean* (BioRad)
- Font de corrent elèctrica
- Tampó d'electroforesi 10X (Tris base 250 mM, glicina 1.92 M, SDS 1%, pH 8.3). Utilitzar a 1X
- Tampó de càrrega LSB 4X (Per 40 mL: 8 mL Tris-HCl 2 M pH 6.8, 32 mL glicerol, 3.2 g SDS, 160 µL de blau de bromofenol). Utilitzar a 1X
- Solució gel separador (1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 0.1% SDS)
- Solució gel concentrador (0.5 M Tris-HCl pH 6.8 0.1% SDS)
- Acrilamida/Bisacrilamida 40% (37.5:1) (BioRad)
- APS (Persulfat d'amoni 10% en aigua)
- TEMED
- Estàndards de pes molecular pretenyits (BioRad o Fermentas)

- Metodologia

1. Preparació de les mostres. En un tub eppendorf, preparar la quantitat de proteïna desitjada (entre 1 i 100 µg per mostra) i afegir el volum de LSB 4X perquè quedi a una concentració final de 1X. Les mostres s'escalfen en un termoagitador i la temperatura dependrà del tipus de proteïna a detectar. Rutinàriament, es processen a 56°C durant 2 minuts per evitar que es formin agregats. Fer un *spin* a les mostres.

2. Polimerització del gel. Prèviament al muntatge del sistema d'electroforesi, netejar amb etanol totes les peces que estan en contacte amb les proteïnes. El sistema es munta segons les indicacions del fabricant (BioRad). L'APS i el TEMED son els últims reactius a afegir a la solució dels gels. En la següent taula es mostren les relacions dels diferents reactius pels percentatges dels gels d'acrilamida més habituals.

Barrejar la solució lleugerament per inversió i dipositar lentament entre els vidres del sistema, vigilant que no es formin bombolles. El gel separador ha d'ocupar les tres quartes parts inferiors del sistema. Abans de la polimerització, s'afegeix una capa d'isopropanol a la part superior del gel perquè el límit superior sigui recte i no presenti bombolles. Un cop polimeritzat el gel separador, decantar l'isopropanol, rentar amb aigua i dipositar-hi el gel concentrador. Ràpidament col·locar la pinta (abans que es produeixi la polimerització del gel concentrador). A continuació, muntar el sistema de

vidres amb els gels polimeritzats a la cubeta d'electroforesi i omplir-la de tampó d'electroforesi 1X, de manera que hi hagi continuïtat elèctrica.

3. Electroforesi. Extreure la pinta i carregar les mostres a més del marcador de pes molecular. Tancar el circuit amb la tapa de la cubeta i connectar a una font d'alimentació a un voltatge constant de 100-140 V, fins que el marcador de pes molecular s'hagi separat suficientment per poder detectar la proteïna d'interès.

## 2) Transferència

Un cop finalitzada la separació electroforètica, les proteïnes son electrotransferides a una membrana porosa de fluorur de polivinilide (PVDF) de manera que hi quedi immobilitzades permetent la posterior immunodetecció.

### • Materials i reactius

- Sistema de transferència Trans Blot Turbo (BioRad)
- Paper Whatmann 3mm (6 rectangles per cada gel, de la mateixa mida que el gel separador). 3 rectangles en contacte amb l'ànode i 3 en contacte amb el càtode
- Membrana Immobilon-P (Millipore) (un rectangle de membrana de transferència per cada gel, de la mateixa mida que el gel separador)
- Tampo de transferència ànode (0.3 M Tris base, 20% metanol, en aigua Milli-Q)
- Tampo de transferència càtode (40 mM àcid 6-aminocaproic, 20% metanol, en aigua Milli-Q)
- Metanol

### • Metodologia

1. Primer, cal hidratar la membrana de manera que sigui receptiva a immobilitzar proteïnes. Submergir la membrana en una cubeta amb metanol absolut durant 3 minuts.
2. Mentrestant, preparar els cassets de transferència. Obrir el casset, empapar 3 rectangles de paper Whatmann amb el tampó ànode i passar-los per la superfície de la base del casset (corresponent a l'ànode), de manera que quedi ben impregnat.
3. A sobre d'aquests, posar-hi la membrana ja activada.
4. Desmuntar els vidres on es troba el gel. Amb l'ajuda d'una espàtula, descartar el gel concentrador i amb molta cura transferir el gel separador a sobre de la membrana.
5. Per evitar que la presència de bombolles interfereixin amb la transferència, passar un *roller* per sobre del gel aplicant certa pressió.
6. Empapar 3 rectangles de paper Whatmann amb el tampó càtode i passar-los per la superfície de la tapa del casset (corresponent al càtode), de manera que quedi ben impregnat.

7. Amb compte, posar la tapa del casset i tancar-lo.

8. Segons la mida de les proteïnes d'estudi es poden aplicar diferents protocols modificant la intensitat de la current i la durada de la transferència. Rutinàriament s'ha utilitzat el protocol *Standard* ja programat en l'aparell que permet transferir proteïnes de tots els pesos moleculars, el qual aplica una current de 25 V i 0.1 A durant 30 minuts.

### 3) Immunodetecció

Un cop s'han transferit les proteïnes a la membrana, es procedeix a la detecció de la proteïna d'estudi mitjançant anticossos específics. Durant aquest treball s'han realitzat WBs contra diferents proteïnes utilitzant anticossos policlonals i monoclonals que es descriuran en cada apartat dels resultats.

#### • Materials i reactius

- Solució de Ponceau (àcid acètic 5% en aigua (v/v), ponceau 0,1%)
- Solució de bloqueig (5% de llet desnatada en pols en TTBS 1X)
- Anticossos primaris diluïts en solució de bloqueig (depèn de cada anticòs)
- Anticossos secundaris conjugats amb peroxidasa de rave (HRP) ( dilució 1:5000 de l'stock en glicerol)
- Solució de rentat TTBS 10X (100 mM Tris base, 1.5 M NaCl, 1% Tritó X-100, pH 7.5). Utilitzar a 1X
- Reactiu ECL pel revelat (veure annex de solucions)
- *Hyperfilms* (Amersham) i casset de revelat

#### • Metodologia

1. Desmuntar el casset de transferència i recuperar la membrana. Incubar-la amb la solució de Ponceau en una cubeta fins que es tenyeixin les proteïnes. Així es pot comprovar que la transferència ha funcionat correctament i observar si han quedat bombolles. La membrana es destenyeix amb rentats de TTBS 1X.

2. Bloqueig de la membrana. És necessari bloquejar la membrana per evitar interaccions inespecífiques dels anticossos a les proteïnes electrotransferides. Incubar durant 1 hora i en agitació amb la solució de bloqueig que bloquejarà els llocs d'interacció inespecífica.

3. Incubar amb anticòs primari. L'anticòs primari s'ha de diluir en solució de bloqueig per tal d'establir certa competència entre les proteïnes de la llet (unions inespecífiques) i l'anticòs (unions específiques), de manera que l'anticòs no tingui cap altra possibilitat que la d'unir-se a la proteïna a la que està dirigit. La incubació es realitza en una bossa de plàstic Glad segellada que conté la membrana bloquejada i l'anticòs primari diluït (1

mL). Es manté en agitació orbital suau durant 1 hora a temperatura ambient o durant 16 hores a 4°C.

4. Rentar per tal d'eliminar l'excés d'anticòs i les unions inespecífiques. Rentar tres vegades durant 10 minuts amb TTBS 1X en agitació suau a temperatura ambient.

5. Incubar la membrana amb anticòs secundari (específic per als dominis Fc de les immunoglobulines G, conjugats a l'enzim peroxidasa) per detectar les unions específiques de l'anticòs primari amb la proteïna d'estudi. Això permet detectar la interacció mitjançant una reacció hidrolítica que genera llum. Diluir l'anticòs secundari en solució de bloqueig i incubar durant 1 hora a temperatura ambient, en agitació i tapat de la llum.

6. Rentar tres vegades durant 10 minuts amb TTBS 1X en agitació suau a temperatura ambient.

7. Revelar la membrana incubant-la amb una solució que conté luminol, compost que en ser hidrolitzat per la peroxidasa genera llum. Aquesta llum es detecta mitjançant l'exposició de la membrana sobre un film fotogràfic. Incubar la membrana amb la solució de ECL durant 1 minut i retirar l'excés. El revelat es fa en una cambra fosca amb l'ajuda d'un casset de revelat, efectuant exposicions a diferents temps sobre el paper fotogràfic *hyperfilm* d'alta sensibilitat. Els films es revelen en un aparell de revelat fotogràfic (Fujifilm).

8. En els casos que es requereixi una quantificació de les bandes obtingudes, s'escaneja el paper fotogràfic i s'utilitzen els *softwares* informàtics *ImageJ* i *MultiGauge* (Fujifilm) per obtenir els valors d'intensitat de les bandes.

### 2.3 OBTENCIÓ D'ANTICOSSOS POLICLONALS

Al llarg d'aquesta tesi s'han anat generant diferents eines necessàries per estudiar les proteïnes clc en el peix zebra. Una de les més importants és la generació d'anticossos contra les proteïnes d'interès. Alguns s'han generat i utilitzat per a la realització d'aquesta tesi i altres s'han utilitzat en altres projectes del grup. En aquest apartat s'explica la purificació d'un dels anticossos que s'ha utilitzat en aquesta tesi com a exemple de la metodologia.

A través dels serveis de l'empresa *EUROGENTEC*, s'immunitzen dos conills per obtenir un anticòs contra cada proteïna d'interès de peix zebra. Primer es dissenya un pèptid sintètic corresponent a la proteïna contra la que es vol obtenir l'anticòs, i per predicció informàtica es selecciona una regió amb un nivell alt d'antigenicitat i que no mostri homologia amb altres proteïnes (especialment quan es vol discriminar entre paràlegs, com en el cas de clc-1a i clc-1b). Es realitzen 3 injeccions a cada animal i

posteriorment s'obtenen els sangrats de cada un dels conills. Aquests es van provar per Western blot en extractes cel·lulars on s'hi ha transfectat el plàsmid corresponent. Com a control negatiu s'utilitzen els sèrum pre-immunes. Finalment, s'escull el sèrum on es detecta millor la proteïna i es purifiquen les immunoglobulines G (IgG) per afinitat utilitzant el corresponent pèptid.

### 2.3.1 Purificació de IgGs mitjançant afinitat per al pèptid

Les IgGs amb major senyal es van seleccionar i purificar per afinitat amb el pèptid amb el que va ser immunitzat l'animal del qual es va obtenir el sèrum. Aquests pèptids sintètics presenten la següent particularitat: tenen una cisteïna reduïda. El seu grup sulfidril és capaç d'acoplar-se covalentment a una resina *SulfoLink* (Pierce) que permet la purificació de l'anticòs a través d'aquesta columna d'afinitat. Mitjançant una activació iode-acetil, el pèptid té la capacitat d'unir-se covalentment i de manera estable a la resina. Després de bloquejar els llocs d'unió inespecífics, s'incuba la columna amb el sèrum. D'aquesta manera, només els anticossos capaços de reconèixer el pèptid específicament s'unirien a la resina de la columna amb el pèptid acoplat. Finalment, aquests anticossos units a la resina s'elueixen de la columna amb una solució àcida de glicina pH 2.5.

- Materials i reactius
  - Pèptid (proporcionat per la casa comercial)
  - Columna de cromatografia *Bio-Rad* de polipropilè de 10 mL de capacitat
  - Resina d'acoplament *Sulfolink* (Pierce)
  - Tampó d'acoplament 5X (Tris-HCl 250 mM, EDTA 25 mM pH 8.5)
  - Solució de bloqueig (Cisteïna 50 mM en tampó d'acoplament 1X)
  - Solució de rentat (NaCl 1 M)
  - Solució de manteniment (NaN<sub>3</sub> 1 mM en PBS 1X)
  - TBS 1X
  - PBS 1X
  - Tris 1 M pH 9
  - Tampó de neutralització (Tris 1 M, NaCl 2 M pH 8.5)
  - BSA 1mg/mL
  - Tampó d'elució (Glicina 100 mM pH 2.5)
  - Sèrum amb IgGs



- Metodologia

### **A) Acoplament del pèptid a la columna**

1. Preparar 1 mg de pèptid (si l'anticòs s'ha generat contra dos pèptids, preparar 1 mg de cadascún) en 200 µL d'aigua Milli-Q i 50 µL de tampó d'acoplament 5X. Barrejar-los fins aconseguir una completa homogenització. Guardar una alíquota de 10 µL i rotular-la com a "pèptid abans de l'acoplament".
2. Afegir 1.5 mL de resina *Sulfolink* en la columna *Bio-Rad* i equilibrar amb 6 volums (9 mL) de tampó d'acoplament 1X (és important que la columna no es quedi seca).
3. Després d'equilibrar la columna, aplicar la barreja del pèptid (250 µL) i 2 mL de tampó d'acoplament 1X. Tapar la columna i homogenitzar bé el pèptid amb la resina. Incubar durant 2 hores en un orbital a temperatura ambient.
4. Destapar la columna i deixar caure per gravetat. És convenient recollir una altra alíquota i rotular-la com a "pèptid després de l'acoplament". Mesurar la concentració de les dues mostres a 280 nm. La comparació ens donarà una idea de la quantitat de pèptid que ha quedat unit a la columna. Si s'observa que el percentatge d'acoplament és baix, deixar la incubació més temps.
5. Aplicar a la columna 2 mL de solució de bloqueig, incubar durant 15 minuts en agitació orbital a temperatura ambient i després 30 minuts més sense agitació.
6. Deixar caure la solució de bloqueig i rentar la columna amb NaCl 1M. A partir d'aquest pas, el pèptid es troba acoplat a la columna cromatogràfica. Aquesta columna es pot reutilitzar en el futur per a purificar mes anticòs.
7. Guardar la columna amb  $\text{NaN}_3$  NaCl 1M, ben tapada (aconsellable segellar les dues obertures amb parafilm) i a 4°C.

### **B) Purificació del sèrum per afinitat**

1. Preparar una dilució del sèrum en TBS 1X a una relació 3:1 (6 mL de sèrum en 2 mL de TBS 1X). Habitualment la relació seria 1:1, però per augmentar l'eficiència de purificació s'ha modificat la relació. El pH ha d'estar ajustat a 8.5 amb Tris 1M pH 9.
2. Rentar la columna activada amb el pèptid dues vegades amb TBS 1X i incubar amb la barreja de sèrum i TBS 1X durant 3-4 hores en un orbital a temperatura ambient.
3. Passat el temps d'incubació, eluir la barreja per gravetat, rentar la columna dues vegades amb PBS 1X i un tercer cop amb PBS 0.1X.
4. Per eluir la columna, afegir glicina 100 mM pH 2.5. L'eluït es recull en 16 fraccions de 200 µL de volum final en tubs de 1.5 mL, on prèviament s'ha afegit 20 µL de tampó de neutralització i 12 µL de BSA 1mg/mL (amb la finalitat de neutralitzar el pH àcid de la mostra). Per tant, s'afegeixen 168 µL de glicina i es recullen les fraccions de manera continuada.

5. Quan es tinguin recollides totes la fraccions, rentar la columna amb solució de rentat i finalment es guarda amb 4 mL de la solució de  $\text{NaN}_3$  NaCl 1M a 4°C.

Les fraccions es dilueixen 1/50 en llet al 5% en TTBS 1X i es proven per Western blot. Com a control positiu s'utilitza l'anticòs Flag a dilució 1/500. Finalment es barregen les fraccions amb major intensitat de senyal.

## 2.4 IMMUNOFLUORESCÈNCIA

Durant aquesta Tesi s'han realitzat estudis d'immunofluorescència en cèl·lules HeLa i en cultius primaris de fibres musculars. S'ha estudiat la localització de les proteïnes GlialCAM, CIC-2, clc-2a, clc-2b, clc-2c, clc-1a, clc-1b, clc-k, barttin, Clc-K1 i Barttin en HeLa i clc-1a, clc-1b i DHPR en les fibres musculars.

### • Materials i reactius

- Cultiu cel·lular en cobreobjectes
- Placa de cultiu de 24 pous
- Pinces de cirurgia de precisió
- Portaobjectes
- PBS 1X estèril
- Paraformaldehid (PFA) 3% en PBS 1X
- Solucions d'autofluorescència ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  50 mM en PBS 1X i Glicina 20 mM en PBS1X).
- Solució de bloqueig i permeabilització (PBS 1X, 10% FBS, 0.1% Tritó X-100)
- Anticòsos primaris (la dilució depèn de cada anticòs) i secundaris (dilució 1/500)
- Medi de muntatge *Vectashield* (Vector)
- DAPI (150 ng/mL)

### • Metodologia

1. Aspirar el medi de les plaques de cultiu i rentar tres vegades amb PBS 1X.
2. Fixar les cèl·lules amb PFA 3% durant 15 minuts a temperatura ambient.
3. Rentar 3 vegades amb PBS 1X per tal d'eliminar l'excés de PFA. Si no es realitza la immunofluorescència al moment, guardar els cobreobjectes fixats a 4°C en PBS 1X + 0.05%  $\text{NaN}_3$ , per tal d'evitar possibles contaminacions.
4. Transferir els cobreobjectes a una placa de 24 pous (amb la cara que conté les cèl·lules cap amunt!) i afegir PBS 1X. (**Nota:** és important no deixar els cobreobjectes secs).

5. Per tal d'eliminar l'autofluorescència de les cèl·lules, incubar en una solució de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  50 mM durant 10 minuts i seguidament en una solució de glicina 20 mM durant 10 minuts més (**Nota:** aquest pas és opcional).
6. A continuació es bloqueja i permeabilitza la mostra alhora amb la solució de bloqueig i permeabilització durant 2 hores a temperatura ambient i en agitació.
7. Incubar els cobreobjectes amb l'anticòs primari a la dilució adient en la solució de bloqueig i permeabilització (és recomanable centrifugar l'anticòs per evitar l'agregació de les immunoglobulines). Per fer-ho, dipositar 50  $\mu\text{L}$  de l'anticòs sobre un fragment de parafilm fixat sobre una superfície plana i, amb l'ajuda d'unes pinces de precisió, col·locar el cobreobjectes sobre la gota d'anticòs posant en contacte les cèl·lules amb la gota. La incubació es pot fer durant 1 hora a temperatura ambient o durant 12 hores a  $4^\circ\text{C}$  col·locant els cobreobjectes dins d'una cambra humida per evitar que la gota s'evapori.
8. Després de la incubació amb l'anticòs, procedir a rentar els cobreobjectes. Per això, es tornen a passar a la placa de 24 pous amb les cèl·lules cara amunt (si la incubació amb l'anticòs primari ha sigut durant 12 hores a  $4^\circ\text{C}$ , els cobreobjectes s'han d'atemperar durant 15 minuts a temperatura ambient abans de procedir amb els rentats). Fer 3 rentats de 10 minuts amb solució de bloqueig i permeabilització, per eliminar l'excés d'anticòs primari.
9. Preparar l'anticòs secundari marcat amb un fluorocrom en la solució de bloqueig i permeabilització a una dilució 1/500. A partir d'aquest moment, mantenir les mostres sempre protegides de la llum. Incubar 2 hores a temperatura ambient.
10. Fer 3 rentats amb PBS 1X de 10 minuts cada un a temperatura ambient.
11. Muntar els cobreobjectes sobre un portaobjectes de vidre, on s'hi afegix una gota del medi de muntatge *Vectashield*, generalment amb DAPI (1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), el qual emet en la longitud d'ona de la llum ultraviolada. Les cèl·lules han de quedar en contacte amb el medi. Deixar assecat els portaobjectes durant 5 minuts tapats de la llum i assecat l'excés de medi.
12. Fixar els cobreobjectes al portaobjectes. Guardar els portaobjectes a la nevera a  $4^\circ\text{C}$  protegits de la llum.
13. Observar les preparacions al microscopi invertit de fluorescència *Olympus DSU amb spinning disk*.

### 3. CULTIUS CEL·LULARS

La manipulació de cèl·lules en cultiu implica treballar en condicions de màxima esterilitat i higiene per tal d'evitar qualsevol contaminació. S'ha de treballar sempre sota una campana de flux vertical i tot el material fungible que s'utilitzi ha de ser estèril. Els medis de cultiu i solucions que estaran en contacte amb les cèl·lules han de ser estèrils (autoclavats, filtrats, irradiats, etc.) i és convenient temperar-los a 37°C en un bany, així com ruixar-los amb etanol al 70% abans de ser utilitzats.

#### 3.1 LÍNIES CEL·LULARS

En aquest treball s'han utilitzat dos tipus de línies cel·lulars: cèl·lules HeLa i cèl·lules HEK293. La línia cel·lular HeLa procedeix d'adenocarcinoma de cèrvix humà, caracteritzada per presentar un fenotip epitelial i tenir incorporades seqüències del papilomavirus humà (HPV-18). La línia HEK deriva de cèl·lules epitelials de ronyó humà, i està transformada amb el gen E1A d'adenovirus (Graham et al, 1977). La línia 293T deriva de la línia 293 que, a més a més, expressa l'antígen T del virus SV40, el qual permet la replicació episomal de plàsmids que continguin un origen i una regió promotora primerenca de SV40.

##### 3.1.1 Condicions generals de cultiu per cèl·lules HeLa i HEK293

Les condicions de cultiu per cèl·lules HeLa o HEK293 són a 37°C, 90% d'humitat relativa i 5% de CO<sub>2</sub>. El medi de cultiu per cèl·lules adherents és el Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Biological Industries) sense suplementar que es guarda a la nevera a 4°C. La suplementació consisteix en afegir substàncies com glutamina, antibiòtics o sèrum fetal boví (FBS) que es mantenen a -20°C. Els antibiòtics utilitzats rutinàriament són la penicil·lina (que inhibeix la síntesi de peptidoglicans de la paret bacteriana) i l'estreptomicina (que inhibeix la síntesi del ribosoma 70S bacterià). El FBS s'ha sotmès a un tractament previ d'inactivació del complement i anticossos a 56°C durant 30 minuts. Regularment es realitzen proves per comprovar l'absència de contaminació per micoplasma. El medi es canvia cada tres dies i es fa un seguiment del creixement del cultiu de manera que quan està proper a la màxima confluència es tripsinitza i es torna a sembrar el cultiu més diluït.

##### 3.1.2 Tripsinització

Quan el cultiu cel·lular arriba aproximadament al 100% de confluència, cal tripsinitzar-lo per evitar que les cèl·lules morin. Primer, cal eliminar el medi i rentar 2-3 vegades amb PBS 1X estèril (**Nota:** aquest pas és essencial, ja que en cas contrari, alguns dels components presents en el FBS del medi inhibeixen l'acció de la tripsina). A

continuació, afegir tripsina-EDTA 1X (Biological Industries) al cultiu. Incubar un màxim de 5 min a l'incubador de 37°C. Quan s'observi al microscopi que les cèl·lules s'han desenganxat, afegir medi de cultiu per inhibir la tripsina i homogenitzar amb molta cura, evitant fer bombolles. A continuació, les cèl·lules es poden comptar i sembrar o fer un cultiu de manteniment.

### **3.1.3 Congelació de cèl·lules**

Les cèl·lules eucariotes tenen la capacitat de suportar processos de congelació quan aquests es donen de forma gradual i amb la presència d'un agent crioprotector que eviti la formació de cristalls d'aigua que puguin trencar la cèl·lula. Una vegada s'han tripsinitzat, les cèl·lules poden ser congelades. Es passen les cèl·lules a un tub i es centrifuguen 5 minuts a 1000 rpm. S'elimina el sobrenedant i es resuspèn el pellet de cèl·lules amb DMEM complet que conté un 10% de DMSO (1 mL per cada  $2 \times 10^6$  cèl·lules). Es fan alíquotes (d'aproximadament 1 mL) en criotubs. Els criotubs es dipositen al congelador de -80°C entre 10 i 16 hores i després es transfereixen al nitrogen líquid.

### **3.1.4 Descongelació de cèl·lules**

El procés de descongelació s'ha de fer ràpidament (al contrari de la congelació), amb l'objectiu d'eliminar el DMSO, tòxic per a les cèl·lules. El criotub es posa en un bany a 37°C. Una vegada descongelat, s'afegeix DMEM complet fins a un volum final de 10 mL. Seguidament, es centrifuga a 5 min a 1000 rpm i s'elimina el sobrenedant. El *pellet* de cèl·lules es resuspèn en 10 mL de medi, es plaqueja i es deixen créixer a l'incubador.

## **3.2 TRANSFECCIÓ CEL·LULAR**

En aquesta Tesi s'ha realitzat transfecció de diferents DNAs en els diferents tipus de línies cel·lulars. Així, la metodologia utilitzada pels diferents experiments de transfecció ha estat l'utilització de la transfectina (BioRad).

### **3.2.1 Transfecció transitòria amb transfectina (BioRad) en cèl·lules HeLa i HEK 293**

- Materials i reactius
  - Medi DMEM complet (10% FBS inactivat, 1% penicilina/estreptomycina, 1% glutamina)
  - Medi Opti-MEM amb Glutamax (Gibco)

- Cultius cel·lulars HeLa o HEK293 (a un 70-80% de confluència)
- PBS 1X estèril
- Agent lipídic: transfectina (BioRad)
- Aigua Milli-Q estèril
- Preparació de DNA plasmídic d'interès

- Metodologia

El procediment a seguir, així com els volums que s'han d'utilitzar en cada tipus de placa, vénen descrits en els manuals dels productes. El protocol descrit a continuació és per plaques de 6 pous.

1. Sembrar les cèl·lules un dia abans de manera que la confluència sigui del 70-80% (aproximadament, 420000 cèl·lules per pou) en el moment de la transfecció (per la transfecció amb agents lipídics es requereix d'una confluència alta degut a la seva alta toxicitat).
2. Preparar una barreja amb el DNA i el medi Opti-MEM, utilitzant 2 µg de DNA en un volum final de 250 µL (**Nota:** 2 µg de DNA és la quantitat estàndar, però es pot modificar segons la necessitat. Els plàsmids que costin de transfectar, es pot posar fins a 3 µg).
3. En un altre tub, preparar una barreja de transfectina amb Opti-MEM una relació 1:1 transfectina:DNA, també en un volum final de 250 µL.
4. Ajuntar les dues barreges (la del DNA i Opti-MEM amb la de l'agent lipídic i Opti-MEM) i incubar durant 20 minuts a temperatura ambient.
5. Durant la incubació, retirar el medi de cultiu de les plaques i rentar amb PBS 1X estèril amb l'objectiu d'eliminar traces d'antibiòtic. Després, afegir 1.5 mL de medi Opti-MEM a cada pou i deixar equilibrar a 37°C a l'incubador (**Nota:** si es treballa amb cèl·lules HEK, evitar els rentats amb PBS ja que degut a la baixa adhesió de la línia, es perdria gran quantitat de cèl·lules).
6. Un cop han passat els 20 minuts, afegir la barreja gota a gota a cada pou mentre es mou la placa en forma de creu de manera que quedi ben repartida.
7. Incubar 4 hores a 37°C
8. Retirar el medi i rentar les cèl·lules amb PBS 1X esteril, de manera que s'eliminin les restes d'agent lipídic (**Nota:** si es treballa amb cèl·lules HEK, evitar els rentats amb PBS ja que degut a la baixa adhesió de la línia, es perdria gran quantitat de cèl·lules).
9. Afegir 2 mL de medi DMEM complet. Incuben les cèl·lules de 24 a 48 hores a 37°C perquè s'expressin les proteïnes.

### 3.3 CULTIU PRIMARI DE FIBRES MUSCULARS AÏLLADES DE PEIX ZEBRA

Adaptant el protocol de Horstick et al. (Horstick et al, 2013) hem aconseguit establir cultius primaris a partir d'un petit pool d'embrions de 48 hpf amb un alt rendiment, gran quantitat de fibres musculars aïllades i bastant pur, tot i la senzillesa del protocol.

- Materials i reactius

- Col·lagenasa D 3.125 mg/mL en medi de cultiu independent de CO<sub>2</sub> sense suplementar
- Medi de cultiu independent de CO<sub>2</sub> (Gibco) sol o suplementat amb FBS 10%
- PBS 1X
- PFA 3% en PBS 1X
- Poli-ornitina 50 µg/mL en DMSO estèril
- Embrions de 1 a 3 dpf

- Metodologia

1. Dipositar el nombre d'embrions desitjat en un tub eppendorf de 1.5 mL i eliminar l'excés de medi d'embrions, sense secar-los (**Nota:** en aquesta tesi s'ha fet a partir de *pools* de 10 embrions de 48 hpf i s'han aconseguit uns bons resultats).
2. Afegir 300 µL de col·lagenasa. Cada 30 minuts triturar **suaument** els embrions amb un *micropotter* o una punta groga de pipeta (**Nota:** destacar la trituració suau, la idea és ajudar a disgregar els embrions per dissociar les fibres musculars. Si la trituració és massa forta podem fer malbé les fibres).
3. Després d'incubar la col·lagenasa 1 hora i 30 minuts, centrifugar 5 minuts a 380 x g a temperatura ambient.
4. Aspirar suaument el medi (**Nota:** aspirar suaument, el *pellet* es desenganxa amb molta facilitat).
5. Resuspendre amb 250 µL de medi de cultiu independent de CO<sub>2</sub> suplementat i sembrar en cubres prèviament tractats amb poli-ornitina (**Nota:** també funciona amb poli-lisina, però aquí ho hem fet sempre amb poli-ornitina).
6. Deixar el cultiu entre 5 hores i o/n a l'incubador de peixos, a 28°C. Seguidament, procedir amb el protocol d'immunofluorescència de línies cel·lulars, amb l'excepció de que la concentració de Tritó X-100 ha de ser del 0.25%.

## 4. TÈCNIQUES HISTOLÒGIQUES

Les tècniques histològiques com per exemple, la immunohistoquímica o la microscopia electrònica, es duen a terme en estudis d'anatomia patològica i biologia cel·lular per tal d'estudiar la localització d'una proteïna. En aquesta tesi s'ha estudiat la localització de clc-1a i clc-1b en mostres de teixit muscular esquelètic d'embrions.

Per a la utilització d'aquest tipus de tècniques, els animals utilitzats han sigut anestesiats i sacrificats prèviament. A continuació s'extreuen els teixits que es volen utilitzar.

### 4.1 OBTENCIÓ I PROCESSAMENT D'EMBRIONS I TEIXITS

#### 4.1.1 Obtenció d'embrions de peix zebra

Per obtenir embrions, hem d'aparellar mascles i femelles adults. Es poden posar parelles en caixes individuals (un mascle i una femella) o en caixes més grans on es poden posar fins a 4 parelles alhora (4 mascles i 4 femelles), amb les quals el nombre d'embrions obtinguts sol ser més elevat. Primer s'omplen les caixes amb aigua (disponible al tanc de la sala de peixos de l'estabulari). Seguidament, es posa un compartiment en el qual hi posarem els peixos. A més, la base del compartiment és una reixeta, de manera que quan les femelles posin els ous aquests passin a través de la reixeta i quedin dipositats al fons de la caixa, de manera que quedin fora de l'abast dels peixos i no se'ls mengin. Posar primer els mascles en totes les caixes de creuaments i un cop estiguin tots, posar-hi les femelles. Finalment, tapar la caixa per evitar que els peixos escapin i posar-los als racks.

Els creuaments es posen durant la tarda i al matí següent ja es poden recollir els ous.

Per fer-ho, tornar a dipositar els peixos al seu tanc original. Treure el compartiment. Amb l'ajuda d'un colador o similar, filtrar l'aigua de la caixa. Si hi ha ous, quedaran retinguts al filtre del colador. Dipositar els ous en una placa de Petri amb aigua d'embrions (aigua destil·lada amb 0.3 g/L Red Sea Salt i unes gotes de blau de metilè 1%). Seguidament, deixar-los a l'incubador de 28°C. El mateix dia per la tarda, observar l'estat dels embrions i descartar els morts. Fer un seguiment durant els següents dies de desenvolupament fins l'estadi en què es vulguin processar.



En aquesta tesi s'han realitzat experiments de localització a nivell de proteïna per immunofluorescència a 2 i 3 dies post-fertilització (dpf), i a nivell de transcrit per hibridació *in situ* a 1, 2, 3 i 5 dpf.

#### 4.1.2 Obtenció de teixits de peix zebra

La obtenció de teixits es fa a partir d'animals adults. Per fer-ho, es posen els animals a sacrificar en una caixa amb aigua i excés d'anestèsic (tricaina 0.3%). Un cop deixen de moure els opercles, transferir l'animal a una placa de Petri i sota una lupa, decapitar-lo ràpidament amb un bisturí entre els opercles i les aletes pectorals. Seguidament, recolzar la part dorsal sobre la placa i amb l'ajuda d'unes pinces de cirurgia fixar-lo punxant per la obertura on hi havia el cap. Amb un bisturí, fer una incisió a l'abdomen. Amb l'ajuda d'unes altres pinces, obrir la paret abdominal del peix i, si és femella, treure els ous, seguidament de tot el tracte digestiu, les gònades i el ronyó (mentre el continuem mantenint fixat). El següent pas és treure la pell i les aletes amb les pinces. Finalment, separar el múscul de la columna vertebral (netejar-lo si té restes d'altres teixits)

Per extreure el cervell i els ulls: orientar el cap de manera que la part inferior del crani quedi exposada. Amb molta cura, fixar el cap amb unes pinces mentre amb l'altre mà treiem amb compte els opercles. A continuació, treure la pell del cap. Per extreure els ulls, és de gran ajuda utilitzar unes microestisores quirúrgiques per tallar el nervi òptic. Finalment, trencar el crani i amb compte treure el cervell.

A mesura que s'extreuen els teixit d'interès, dipositar-los ràpidament en tubs eppendorf i congelar al moment, preferiblement, en nitrogen líquid (la neu carbònica també és una bona opció).

En aquesta tesi s'han realitzat experiments de Western blot de proteïna total i de membrana de múscul esquelètic i d'expressió gènica en brànquies, cervell, ulls, cor, intestí, ronyó, fetge, testicles i múscul esquelètic.

#### 4.1.3 Fixació d'embrions

- Materials i reactius
  - Tubs de plàstic de 2 mL amb rosca
  - PFA 4% en PBS 1X pH 7.4
  - Tricaina 0.3%
  - PTU 10X. S'utilitza a 1X, diluït en medi d'embrions
  - PBT (PBS 1X + 0.1% Tween-20)

- Metanol 100%
- Metanol 75%, 50% i 25%, en PBT

- Metodologia

És important tenir en compte que si es vol fer alguna tècnica que impliqui l'ús de microscopia, com una immunofluorescència, la pròpia pigmentació de l'embrió impedirà veure correctament el marcatge. Per això és essencial afegir feniltiourea (PTU 1X) al medi d'embrions un cop passades unes 8-10 hores des de la fertilització (en aquest moment estan acabant el procés de gastrulació i el PTU no serà tòxic). El PTU és un inhibidor reversible de la pigmentació (Whittaker, 1966).

Un cop els embrions tenen l'estadi de desenvolupament desitjat, anestesiar-los afegint 1 mL de tricaina 0.3% en la placa de Petri. Moure la placa en cercles per homogenitzar l'anestèsic en el medi. Esperar aproximadament 1 minut, temps necessari perquè l'anestèsic sigui efectiu. Amb una pipeta Pasteur recollir tants embrions com sigui necessari per l'estudi i posar-los en un tub de 2 mL amb rosca. Treure l'excés de medi i deixar-ne el mínim possible perquè no s'assequin. A continuació afegir PFA 4% i incubar en agitació suau 5 hores a temperatura ambient.

Si l'objectiu final és processar-los per fer seccions en criostat, seguir a l'apartat 4.1.4. Si l'objectiu és fer immunofluorescència o hibridació *in situ*, seguir com s'indica a continuació.

Eliminar l'excés de PFA 4% i rentar amb PBS 1X. Incubar amb dilucions seriades de metanol per deshidratar els embrions (10 minuts per cadascuna, en agitació suau i a temperatura ambient). Començar amb una solució de metanol 25%, seguit de metanol 50%, 75% i finalment 100%. Un cop en metanol, es poden guardar a -20°C fins el moment de procedir amb la tècnica desitjada.

#### **4.1.4 Crioprotecció, inclusió i tall**

- Materials i reactius
  - Sacarosa 30% en PBS 1X
  - O.C.T. (TissueTek)
  - Nitrogen líquid
  - Criostat (Leica)
  - Motlles
  - Portes tractats amb poly-Lisina 5%

- Metodologia

Passades les 5 hores de fixació, s'elimina l'excés de PFA 4% amb 2 rentats en PBS 1X i s'afegeix sacarosa 30% per criopreservar-los. Deixar-los a 4°C fins que els embrions s'enfonsin. Els embrions crioprotegits sinclouen en un motlle on hi ha posem solució especial per fer seccions de teixits congelats, OCT. Aquests motlles es congelen dins d'un recipient en contacte amb nitrogen líquid. Un cop congelats es guarden a -80°C (**Nota:** eliminar l'excés de sacarosa amb molta cura amb paper de filtre, d'aquesta manera millorarà la integritat del teixit).

Per a tallar els blocs s'ha utilitzat un criostat (Leica). Aquest aparell conté un microtom situat al seu interior i es troba a una temperatura entre -18°C -20°C, que manté el bloc congelat sense que es danyi el teixit. Els embrions es van tallar en seccions amb un gruix de 10-14 µm. Els talls es monten directament en portes prèviament tractats amb poly-Lisina 5%. Per preparar els portes, incubar-los durant 2 minuts en la solució de poly-Lisina 5% i deixar-los assecar durant tota la nit a temperatura ambient.

Els portes amb talls es guarden a -20°C fins el moment de realitzar la immunofluorescència.

## 4.2 TÈCNiques DE LOCALITZACIÓ DE RNA MISSATGER

### 4.2.1 Hibridació *in situ*

- Materials i reactius

- Embrions fixats i deshidratats (apartat 4.1.3)
- PBT (PBS 1X tractat amb DEPC + 0.1% Tween-20)
- Metanol 75%, 50% i 25%, en PBT
- Proteinasa K 1 mg/mL en aigua Milli-Q
- PFA 4% en PBS 1X
- Solució d'hibridació (Formamida 50%, SSC 5X, Blocking Powder 2%, Tween-20 0.1%, Heparina 50 µg/mL, RNA de llevat 1mg/mL, EDTA 1mM, CHAPS 0.1%, en aigua Milli-Q tractada amb DEPC)
- Solució de bloqueig (FBS 20%, Blocking powder 0.7% en KTBT)
- Sondes de RNA marcades amb digoxigenina
- Anticòs α-digoxigenina conjugat amb fosfatasa alcalina
- SSC 20X stock (NaCl 3M, citrat de sodi 0.3M, pH 7 en aigua MilliQ)
- KTBT (Tris base 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, KCl 10 mM, Tween-20 0.1% en aigua Milli-Q tractada amb DEPC)

- NTMT (Tris 100mM pH 9.5, MgCl<sub>2</sub> 50mM, NaCl 100mM, Tween-20 0.1%, Levamisole 1mM o 0.012 g/50mL en aigua Milli-Q tractada amb DEPC)
- NBT/BCIP (3 µL NBT + 2.3 µL BCIP/mL NTMT)
- Metilcel·lulosa 3% en Danieau's 0.3X (opcional)

- Metodologia

1. Rehidratar els embrions. Rentar amb dilucions seriades de metanol (75%, 50% i 25%) fins a tenir els embrions en PBT. Els rentats són de 10 minuts cadascún, en agitació suau i a temperatura ambient.
2. Rentar 2 vegades amb PBT.
3. Digerir els embrions amb 1 mL de proteinase K a una dilució 1/1000 en PBT:

1dpf → incubar 10 minuts

2dpf → incubar 30 minuts

≥3dpf → incubar 1 hora

4. Rentar 2 vegades amb PBT (**Nota:** s'aconsella començar pels embrions de 1dpf ja que són més fràgils).
5. Fixar incubant amb PFA 4% durant 20 minuts a temperatura ambient.
6. Rentar 5 vegades amb PBT durant 5 minuts cadascún.
7. Prehibridar els embrions amb 750 µL de solució d'hibridació durant 16 hores a 56°C i agitació suau.
8. Incubar els embrions amb la sonda de RNA diluïda en solució d'hibridació a 56°C i en agitació suau. El temps d'incubació pot variar d'entre 2 hores a 48 hores, depenent de la sonda utilitzada.
9. Rentar 2 vegades amb SSC 2X a 56°C durant 5 minuts cadascún (**Nota:** molt important no trencar la cadena de calor. Quan es treguin els embrions de l'estufa per fer els rentats, s'aconsella tenir preparat un bloc a 56°C per posar-hi els tubs. D'altre banda, podria afectar al resultat final).
10. Rentar 4 vegades amb SSC 2X a 56°C durant 20 minuts cadascún.
11. Rentar 4 vegades amb SSC 0.2X a 56°C durant 20 minuts.
12. Rentar 2 vegades amb KBTB durant 5 minuts a temperatura ambient.
13. Bloquejar durant 2-3 hores amb la solució de bloqueig.
14. Incubar amb l'anticòs α-digoxigenina a una dilució de 1/1000 en solució de bloqueig durant 16 hores a 4°C.
15. Rentar 2 vegades amb KBTB durant 5 minuts.
16. Rentar *n* vegades amb KBTB durant 1 hora (**Nota:** 1 rentat cada hora, com més se'n facin al llarg del dia, millor).

17. Deixar o/n amb PBT a 4°C.
18. Rentar 3 vegades amb NTMT durant 10 minuts.
19. Afegir 1 mL de la solució de revelat NBT/BCIP i deixar en agitació. Controlar la reacció perquè no es doni un excés de tinció (**Nota:** tapar de la llum!).
20. Rentar 2 vegades amb PBT durant 5 minuts.
21. Rentar *n* vegades amb PBT (**Nota:** 1 rentat cada hora, com més se'n facin al llarg del dia, millor).
22. Observar les tincions posant els embrions en plaques a les quals prèviament s'ha afegit agarosa 2%. Per facilitar la observació i poder capturar imatges, es recomana utilitzar metilcel·lulosa 3%.

### 4.3 TÈCNiques D'IMMUNOLocalITZACIÓ

Les tècniques d'immunolocalització es basen en la capacitat dels anticossos d'unir-se específicament als seus corresponents antígens. La reacció específica antígen-anticòs només és visible si l'anticòs està conjugat amb fluoròfor que absorbeix llum a una determinada longitud d'ona i emet a una longitud d'ona major.

#### 4.3.1 Immunofluorescència d'embrió sencer

- Materials i reactius
  - PBS 1X
  - PBT (PBS 1X + 0.1% Tween-20)
  - Metanol 100%
  - Metanol 75%, 50% i 25%, en PBT
  - Proteinasa K 1 mg/mL en aigua Milli-Q
  - PFA 4%
  - Solució de bloqueig: 10% NGS, 1% DMSO i 0.8% Tritó X-100, en PBS 1X
  - Anticossos primaris (dilució adient en solució de bloqueig)
  - Anticossos secundaris (Alexa 488 i 568, dilució 1/100 en solució de bloqueig).
  - Lupa amb làmpara de fluorescència acoplada
- Metodologia
  1. Rehidratar els embrions. Rentar amb dilucions seriades de metanol (75%, 50% i 25%) fins a tenir els embrions en PBS. Els rentats són de 10 minuts cadascún, en agitació suau i a temperatura ambient.
  2. Permeabilitzar incubant amb proteinasa K, tenint en compte l'estadi de desenvolupament dels embrions:

- 1dpf → incubar 15 minuts a una dilució 1/1000
- 2dpf → incubar 40 minuts a una dilució 1/1000
- ≥3dpf → incubar 40 minuts a una dilució 1/500

3. 3 rentats seguits amb PBS 1X
4. Incubar amb PFA 4% durant 20 minuts a temperatura ambient.
5. 3 rentats de 5 minuts amb PBT.
6. Incubar amb solució de bloqueig durant 1 hora.
7. Incubar amb l'anticòs primari a la dilució adient durant 16 hora a 4 °C.
8. Al dia següent, rentar  $n$  vegades cada hora amb PBT (**Nota:** 1 rentat cada hora, com més se'n facin al llarg del dia, millor).
9. Incubar amb l'anticòs secundari durant 16 hores a 4 °C.
10. Al dia següent, rentar  $n$  vegades cada hora amb PBT (**Nota:** 1 rentat cada hora, com més se'n facin al llarg del dia, millor).
11. Mirar a la lupa amb la làmpara de fluorescència.

#### 4.3.2 Immunofluorescència per talls fins

Aquest tipus d'immunofluorescència s'utilitza per a talls menors de 30  $\mu\text{m}$ . El procediment es fa tot a sobre dels talls, els quals ja estan montats en portaobjectes. És molt important crear un entorn hidrofòbic al voltant dels talls amb un llapis especial (PAP-PEN, Sigma) i mantenir els portaobjectes en una càmera humida durant tot el procés.

- Materials i reactius
  - Portaobjectes i cobreobjectes
  - PBS 1X
  - Solució de bloqueig (sèrum normal de cabra (NGS) 3%, albúmina sèrica bovina (BSA) 1%, Tritó-X100 0.1% en PBS 1X)
  - Solució de dilució d'anticossos (sèrum normal de cabra (NGS) 1%, albúmina sèrica bovina (BSA) 0.4%, Tritó-X100 0.04% en PBS 1X)
  - Anticossos primaris (dilució segons l'anticòs)
  - Anticossos secundaris (Alexa 488 i 568, dilució 1/500)
  - Solució post-fixadora (PFA 4%, glutaraldehyd 0.02% en PBS 1X)
  - Medi de montatge Vectashield
  - Microscopi confocal *Nikon Eclipse Ti*

• Metodologia

1. Atemperar els talls. Metrestant, preparar la càmera humida. (**Nota:** també es pot començar amb els talls recients fets)
2. Amb el PAP-PEN, marcar el porta al voltant d'on es troben els talls sense tocar-los.
3. Incubar amb la solució de bloqueig durant 1 hora a temperatura ambient.
4. Incubar l'anticòs primari diluït en la solució de dilució durant 16 hores a 4°C.
5. 3 rentats de 10 minuts amb PBS 1X.
6. Incubar l'anticòs secundari en la solució de dilució durant 1 hora a temperatura ambient (**Nota:** molt important, protegir de la llum).
7. 3 rentats de 10 minuts amb PBS 1X.
8. Incubar amb la solució post-fixadora PFA-glutaraldehyd durant 15 minuts a temperatura ambient.
9. 3 rentats de 10 minuts amb PBS 1X.
10. Afegir el medi de muntatge Vectashield i un cobreobjectes.
11. Observades les preparacions amb els objectius de 20x i 60x en el microscopi confocal *Nikon Eclipse Ti*.

## 5. EDICIÓ GENÒMICA EN PEIX ZEBRA

### 5.1 MUTAGÈNESI INDUÏDA PER ENU

L'Institut Sanger ha posat en marxa el projecte "Zebrafish Mutation Project" amb l'objectiu de generar animals mutants per cada al·lel i estudiar-ne la malaltia o fenotip ocasionats per la pèrdua d'aquell gen en concret. Tots els al·lells disponibles són públics i es poden consultar en la seva base de dades i, si algún laboratori n'està interessat, pot adquirir la seva línia d'interès.

Vam adquirir l'al·lel sa13816, el qual genera un codó *stop* prematur en el gen *clcn1b* (T→C). L'addició d'ENU pot ocasionar diverses mutacions en un mateix individu, per tant, s'aconsella fer creuaments fins a obtenir com a mínim la generació F<sub>2</sub> per desfer-se de possibles mutacions no desitjades que podrien portar a un estudi d'un fenotip no real o no ocasionat per la pèrdua del gen d'interès.

Els individus que vam rebre eren els F<sub>0</sub>, resultat de la fertilització *in vitro*. Es va procedir al genotipat (amb el mètode SNP TaMan Assay, apartat 1.5.3.1) d'aquests animals per identificar-ne els heterozigots. Aquests es van creuar entre ells i es van seleccionar els animals les larves dels quals tenien un desenvolupament i morfologies normals. Per generar la següent generació F<sub>1</sub>, es va fer un *outcross* (creuament amb una altre línia, en aquests cas, animals *wild-type*) amb aquells animals suposadament "nets". Es va repetir el mateix procés per aconseguir la F<sub>2</sub> i, a partir d'aquesta es va fer un incross (creuament amb la mateixa línia) per aconseguir animals homozigots mutants.

### 5.2 EDICIÓ GENÒMICA DIRIGIDA AMB CRISPR/CAS9

Vam decidir apostar per posar apunt la tecnologia CRISPR/Cas al nostre laboratori per la generació d'animals *knock out*. Al ser un mètode molt més econòmic, menys tòxic i fàcil d'aplicar ha significat una gran revolució pels laboratoris que treballen amb models animals, especialment en peix zebra, ja que el fa un model encara amb més potencial.

- Materials i reactius
- gRNA contra els gens d'interès
- Cas9 mRNA (Cas9 *wild-type* o nls-Cas9-nls)
- Vermell de fenol
- Danieau's 0.3X



- Metodologia

1. En un tub de 0.2 mL fer la següent barreja:

gRNA	25-100 ng/μL
Cas9 mRNA	300-600 ng/μL
Vermell de fenol	1 μL
Danieau's 0.3X	fins a <b>10</b> μL

2. Fer un spin per homogenitzar-ho i mantenir sempre en gel.

3. Injectar en embrions en estadi d'una cèl·lula (per millorar-ne l'eficiència, injectar dins els citoplasma).

### 5.3 TRANSGÈNESI TRANSITÒRIA – TOL2

El potencial del peix zebra com a model no recau només en la facilitat de modificar el seu genoma per generar *knock out* i *knock in*, sinó que també permet fer experiments de transgènesi amb relativa facilitat. El mètode que s'ha utilitzat en aquesta tesi és el de la transposasa Tol2. Aquesta transposasa és un element autotransponible (té la capacitat de desplaçar-se ell mateix pel genoma) descobert en medaka (Kawakami i Shima, 1999). El grup del Dr. Kawakami va desenvolupar una eina basada en aquest transposó que permet integrar un gran fragment de DNA en el genoma d'una cèl·lula hoste sempre i quan el DNA estigui flanquejat per uns fragments de la Tol2. Aquests fragments són reconeguts per la transposasa *full-length* i ho integra al genoma.

Per realitzar els experiments de transgènesi s'han clonat promotors teixit específics juntament amb gens reporters en un vector que ja conté els fragments Tol2.

- Materials i reactius

- Vector de transgènesi
- Tol2 mRNA
- Vermell de fenol
- Danieau's 0.3X

- Metodologia

1. En un tub de 0.2 mL fer la següent barreja:

DNA	25-300 ng/μL *
Tol2 mRNA	50 ng/μL

Vermell de fenol	1 $\mu\text{L}$
Danieau's 0.3X	fins a un volum final de <b>10 <math>\mu\text{L}</math></b>

\* quan només es té clonat un promotor + GFP/RFP amb 25-50 ng/ $\mu\text{L}$  és molt eficient, però si a més també hi ha clonat un gen tipus clc, injectar 200-300 ng/ $\mu\text{L}$  (tot i que també serà més tòxic)

2. Fer un spin per homogenitzar-ho i mantenir sempre en gel.

3. Injectar en embrions en estadi d'una cèl·lula (per millorar-ne l'eficiència, injectar dins els citoplasma).

#### 5.4 INJECCIÓ EN EMBRIONS DE PEIX ZEBRA

La injecció de qualsevol reactiu, per sobreexpressió, edició genòmica o transgènesi, és més eficient si es realitza en els estadis més primarencs de desenvolupament. Per això sempre es recomana injectar en embrions d'una o dues cèl·lules (excepcionalment en estadi de 4 cèl·lules). Per assegurar-nos que els embrions es trobaran en l'estadi de desenvolupament adequat, és més fàcil si controlem quan es posen els ous. Per això, el dia abans de la injecció es preparen les parelles de la següent manera: posar els mascles en la part inferior de la caixa de creuament, posar-li a sobre el compartiment amb la reixeta i finalment, la femella adult. El volum que es sol injectar és de 1-2  $\mu\text{L}$  per embrió.

- Materials i reactius

- Reactiu a injectar
- Capil·lars
- Injector de pressió
- Portaobjectes graduat
- Oli mineral
- Manipulador
- Lupa
- Motlle d'agarosa en placa de Petri (2% agarosa en aigua d'embrions)
- Pipeta i punxó
- Pinceres de cirurgia

- Metodologia

1. Ajuntar els mascles amb les femelles i deixar-los uns 10-15 minuts perquè posin els ous (**Nota:** és important controlar la posta, ja que si posen molt aviat i deixem que passi el temps es començaran a dividir abans que acabem amb la injecció).

2. Recollir els ous i observar-los a la lupa. Descartar els que no tinguin bon aspecte o no estiguin fertilitzats.
3. Agafar els embrions amb la pipeta i posar-los al motlle amb l'ajuda d'un punxó, amb compte de no trencar-los (**Nota:** s'aconsella orientar l'ou de manera que la cèl·lula quedi mirant cap a la nostre esquerra, així serà més fàcil introduir l'agulla al seu interior).
3. Amb unes pinces de cirurgia, trencar la punta del capil·lar per fer-li una obertura. Carregar 3-4  $\mu\text{L}$  d'injectable per l'altre extrem i fixar-la al manipulador.
4. Calibrar l'agulla. Afegir uns 80-90  $\mu\text{L}$  d'oli mineral al portaobjectes graduat. A través de l'injector, posar una gota de l'injectable en l'oli. Gràcies al diàmetre de la gota es pot mesurar el seu volum i així regular la pressió per alliberar el volum que es vulgui injectar.
5. Regular el *transfer* per evitar un excés de pressió positiva o negativa que interferirien en el procés d'injecció.
6. Injectar tants embrions com es vulgui (**Nota:** s'aconsella fer un mínim de 100 embrions per grup. S'ha de tenir en compte possibles errors d'injecció i mortalitat per toxicitat).
7. Deixar a l'incubador de 28°C un cop finalitzada la injecció.
8. Descartar els embrions morts o malformats al mateix dia.

## 6. TÈCNiques DE COMPORtAMENT EN PEIX ZEBRA

L'estudi del comportament del peix zebra és molt útil per tal d'esbrinar alteracions motores ocasionades per l'administració de fàrmacs o per l'efecte de pèrdues de funció de gens implicat en el moviment, ja siguin a nivell muscular com del sistema nerviós. El desenvolupament d'aparells que permeten l'estudi de gran nombre d'individus ha estat molt útil en aquesta tesi per tal d'esbrinar si la manca de les proteïnes *clc-1* altera el moviment de les larves. S'ha utilitzat el sistema de ViewPoint.

- Materials i reactius

- Aparell de registre ViewPoint
- Plaques de 24 pous blanques amb el fons transparent (recomanable que les parets no siguin transparents, ajuden a evitar reflexes de la llum)
- Medi d'embrions

- Metodologia

1. El dia abans de realitzar l'experiment de comportament, transferir les larves d'estudi en les plaques blanques de 24 pous. Degut a la gran variabilitat observada es recomana utilitzar almenys 2 o 3 plaques per grup d'estudi. Afegir 700  $\mu$ L de medi d'embrions en cada pou.
2. En el moment de realitzar l'experiment, situar la placa amb les larves amb molta cura al suport de l'aparell de registre.
3. Aplicar el protocol d'interès.
4. Un cop realitzats els experiments, es poden congelar els embrions individualment per tal de procedir amb l'extracció de DNA i el posterior genotipat.

Factors que es recomanen tenir en compte:

- Per tal de comparar un paràmetre entre diversos grups d'estudi, és necessari disposar d'una bona resolució per tal de ser capaç de discriminar diferències. Així doncs, per l'estudi de l'activitat motora es recomana realitzar l'experiment a 7 dpf.
- Un altre factor és la presència i la intensitat de la llum. Tots els experiments s'han realitzat amb llum a una intensitat del 8%.
- La freqüència dels estímuls utilitzats ha estat de 50 Hz, independentment de si la durada era de un o dos segons.
- Per tal de que els resultats siguin el més reproduïble possible, es recomana realitzar els experiments amb la mateixa temperatura (la temperatura òptima és 28°C). Per això es disposa d'una unitat de control de temperatura amb un circuit d'aigua.

## **ANNEX 1: SOLUCIONS D'ÚS GENERAL**

### **AMPICIL·LINA**

Es dissol l'ampicil·lina en aigua Milli-Q a 100 mg/mL, es filtra a 0.22 µm i es guarda aliquidada a -20°C. Una vegada descongelada, es manté en gel. S'ha de tenir en compte que l'ampicil·lina s'inactiva a temperatures superiors a 55°C. LA concentració de treball és de 100 µg/mL.

### **KANAMICINA**

Es dissol la kanamicina en aigua Milli-Q a 25 mg/mL, s'aliquota i es guarda a -20°C. La concentració de treball és de 25 µg/mL.

### **CLORAMFENICOL**

Es dissol en metanol a 25 mg/mL i es guarda aliquidat a -20°C. La concentració de treball és de 25 µg/mL.

### **MEDI LB, LB-AGAR**

Es dissol en aigua Milli-Q: 1% triptona, 0.5% extracte de llevat, 1% NaCl. En el cas de preparar LB-Agar, s'afegeix l'agar (1.5% en pes) a l'ampolla que conté LB. S'autoclava, es deixa refredar fins a 50°C i s'hi afegeix l'antibiòtic (si és necessari). S'aboca a les plaques de Petri i es deixa solidificar a temperatura ambient. Les plaques es guarden a 4°C en posició invertida.

### **TAE 50X**

Es pesen 242 g de Tris Base i s'afegeixen 57.1 mL d'àcid acètic i 100 mL de EDTA 0.5 M. S'ajusta amb aigua fins a 1 L.

### **PBS 10X**

Es dissol en aigua Milli-Q: 1.36 M NaCl, 27 mM KCl, 80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 15 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> i s'ajusta el pH a 7.4 amb HCl. Si el PBS 1X és per cultius cel·lulars, s'autoclava.

### **PARAFORMALDEHID (PFA) 4%**

Cal manipular el PFA sempre sota la campana perquè és molt tòxic. Per 500 mL, es pesen 20 g de paraformaldehid en un vas de precipitats de vidre. En un altre vas s'escalfa 450 mL d'aigua Milli-Q fins que arriba a 60°C. Es va abocant l'aigua calenta al vas amb el PFA i es barreja amb un agitador. Quan està dissolt es tiren 2-3 gotes de

NaOH 1 N fins que la solució quedi transparent. Es deixa refredar i s'afegeixen 50 mL de PBS 10X. Es fan alíquotes i es congelen a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **TAMPÓ DE CÀRREGA DE PROTEÏNES LSB 4X**

En un volum de 40 mL, es preparen 8 mL de Tris HCl 2 M a pH 6.8, 32 mL de glicerol, 3.2 g de SDS i 160  $\mu\text{L}$  de blau de bromofenol. Si és necessari es poden afegir agents reductors: 1-10%  $\beta$ -Mercaptoetanol o 100mM DTT.

### **TAMPÓ D'ELECTROFORESI 10X**

(Tris base 250 mM, glicina 1.91 M, SDS 1%). Per un litre es pesen: 30.3 g de Tris, 144 g de glicina i 10 g de SDS. S'ajusta el pH a 8.3.

### **TAMPÓ DE TRANSFERÈNCIA 10X**

(Tris base 250 mM, glicina 1.92 mM). Per un litre es pesen: 3.3 g de Tris i 144 g de glicina. S'ajusta a pH 8.3.

Tampó de transferència 1X: 100 mL de tampó de transferència 10X, 200mL de metanol i 700 mL d'aigua. Es pot reciclar un parell de vegades guardant-lo a  $4^{\circ}\text{C}$ .

### **TTBS 10X**

Es dissol en aigua Milli-Q, 1.5 M NaCl, 100 mM Tris HCl, i s'ajusta a un pH de 7.4. Posteriorment se li afegeix 1% de Tween-20 o Tritó X-100 i s'agita suaument fins que el detergent queda ben dissolt.

### **ECL**

Es preparen 2 solucions *stock*: una de 90 mM d'àcid coumàric i una altra de 250 mM de luminol (ambdúes amb DMSO, protegides de la llum i guardades a  $-20^{\circ}\text{C}$ ).

Solució A: 5 mL Tris 1 M pH 8.5, 45 mL aigua, 110  $\mu\text{L}$  d'àcid coumàric 90 mM, 250  $\mu\text{L}$  de luminol 250 mM.

Solució B: 100  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30% i 900  $\mu\text{L}$  d'aigua.

Les dues solucions es conserven a  $4^{\circ}\text{C}$  protegides de la llum. El reactiu ECL pel revelat es fa amb una relació 1 mL solució A + 20  $\mu\text{L}$  solució B.

### **TRIS 1M**

Es pesen 60.5 g de 2-amino-2(hydroxymethyl)-1-3propanediol (Tris) en 500 mL d'aigua Milli-Q. S'ajusta al pH desitjat i es filtra.

### **EDTA 0.5M**

Es dissol 90.3 g d'àcid etilen-diamino-tetra-acètic (EDTA) en aigua destil·lada i s'ajusta el pH a 8 amb NaOH (la solució passa de tènue a transparent).

### **HEPES 1M**

Es pesen 119 g de 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethane-sulfonic acid (Hepes) en 500 mL d'aigua Milli-Q. S'ajusta el pH a 7.4 i es filtra.

### **DANIEAU'S 1X**

Preparar HEPES 250 mM, NaCl 2.9 M, CaCl<sub>2</sub> 30mM, KCl 35 mM i MgSO<sub>4</sub> 20 mM en aigua Milli-Q. Filtrar totes les solucions per separat abans de barrejar-les.

### **MEDI D'EMBRIONS**

Dissoldre 0.3 g/L de Red Sea Salt en aigua Milli-Q. Afegir unes gotes de blau de metilè 1% per utilitzar-la en embrions que encara no hagin estat decorionats.

### **PTU 10X**

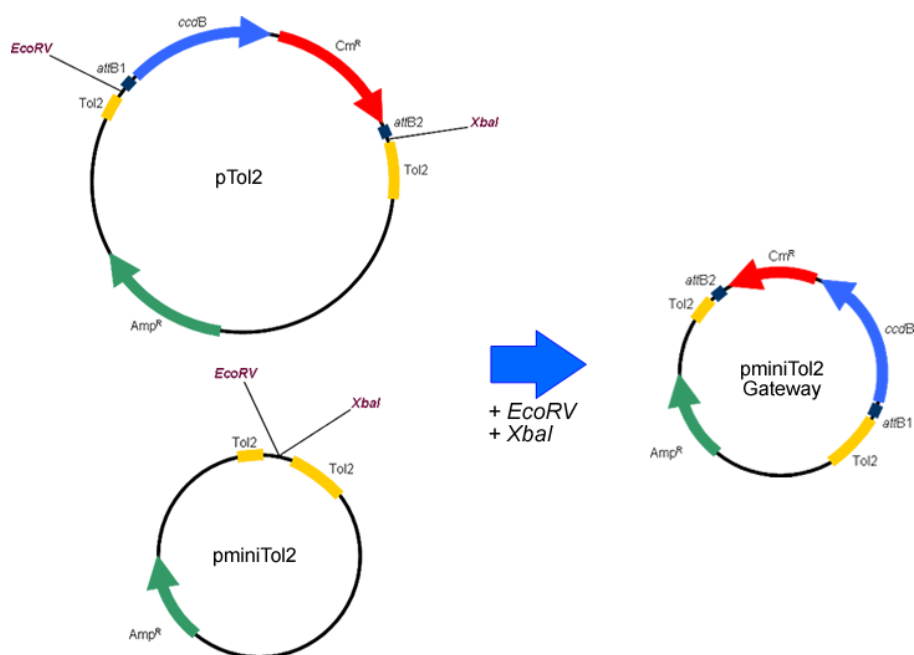
Dissoldre N-feniltiourea (Sigma) a una concentració de 0.03% en aigua Milli-Q (30 mg de pols en 100 mL). Utilitzar la solució de treball PTU 1X diluïnt en medi d'embrions.

## ANNEX 2: PLÀSMIDS GENERATS PER BIOLOGIA MOLECULAR

### Adaptació del vector miniTol2

La transposasa Tol2 és un element autotransponible identificat en medaka. En els últims anys es va desenvolupar una tècnica basada en la Tol2 que permet la inserció de seqüències de DNA exògenes en una gran diversitat d'espècies, des de cultius cel·lulars a organismes com els *Xenopus*, el pollastre o el peix zebra. Aquest mètode consta d'un plàsmid que conté unes seqüències de l'inici i el final del gen que codifica per la Tol2. Qualsevol seqüència de DNA inserida entre aquests dos fragments s'integrarà en el genoma de la cèl·lula hoste.

Un altre avantatge és que presenta una gran eficiència de transgènesi, aconseguint veure fluorescència en gran part dels embrions injectats, i una alta transmissió per la línia germinal. No obstant, en les nostres mans hem comprovat que quan expressem sota un promotor teixit específic un canal *clc* fusionat a una proteïna fluorescent, aquesta eficiència cau dràsticament i elevat la toxicitat en els embrions. Per aquest motiu vam decidir utilitzar un vector diferent, el pminiTol2, tot i que basat en la mateixa metodologia. La diferència del pminiTol2 és que conté només els fragments mínims de la seqüència Tol2 perquè es doni la transgènesi, donant lloc a un plàsmid molt més petit. No obstant, primer havíem d'adaptar el vector afegint-li el cassette *attB1-attB2* per utilitzar-lo amb el sistema de clonació Gateway, el mètode rutinari per la generació de plàsmids al laboratori.



**Figura 22.** Adaptació del vector pminiTol2 pel seu ús amb el sistema Gateway a partir del vector pTol2.



Breument, vam digerir els vector pTol2 i pminiTol2 amb els enzims de restricció *EcoRV* i *XbaI* per alliberar el cassette *attB1-attB2* i per obrir el vector, respectivament. Seguidament, es lliga el cassette Gateway per lligació al vector pminiTol2. En la figura 22 es mostra un esquema d'aquest procés.

En la Taula 1 es mostren els plàsmids generats durant la tesi.

Insert	Vector	Aplicació
clc-1a 1139-2053	pGEM-T	Sonda per ISH
clc-2b 391-1413	pGEM-T	
FLAGclc-1b	pcDNA3.1	Expressió en línies cel·lulars
FLAGclc-1b Q606X	pcDNA3.1	
clc-1aEGFP	pcDNA3.1	
clc-1bEGFP	pcDNA3.1	
Clc-K1FLAG	pcDNA3.1	
BarttinFLAG	pcDNA3.1	
<i>unc45b</i> ::CIC-1 RFP	pTol2	Transgènesi en peix zebra
<i>unc45b</i> ::CIC-1 A493E RFP	pTol2	
<i>unc45b</i> ::lynRFP	pminiTol2	
<i>unc45b</i> ::clc-1a EGFP	pminiTol2	
<i>unc45b</i> ::clc-1b EGFP	pminiTol2	
slc24a5	pDR274	Generació sgRNA
clc-1a	pDR274	

**Taula 1.** Construccions generades per biologia molecular. S'indica el vector utilitzat on s'han clonat els inserts d'interès i per a què s'han utilitzat.

## ANNEX 3: LLISTA DE PRIMERS

Gen		Seqüència (5'→3')	Aplicació
<i>ef1a</i>	Fw	CTGGAGGCCAGCTCAAACAT	
	Rv	ATCAAGAAGAGTAGTACCGCTACCATTAC	
<i>rpl13a</i>	Fw	TCTGGAGGACTGTAAGAGGTATGC	
	Rv	AGACGCACAATCTTGAGAGCAG	
<i>clcn1a</i>	Fw	GCTGTTGTGACCTTGGTGGTT	
	Rv	CATCAGCTCTCCAGCCATGA	
<i>clcn1b</i>	Fw	CCACCTGGATTGGGTCGAT	
	Rv	TGCAGACATCCAGAACTTCATGA	
<i>clcn2a</i>	Fw	CCTACAGCCCCACGTTGACT	
	Rv	GGTTTGGAGAGCTGTTGAGTGA	
<i>clcn2b</i>	Fw	TCTCTCAAGACGCGCTTCA	Estudis de qPCR
	Rv	CGATCAGCCTGTTGAGATACACA	
<i>clcn2c</i>	Fw	ACGTCTTCGTCGTCCTCTTTG	
	Rv	CAGCACCGATGACGAAAATG	
<i>clcnk</i>	Fw	GCTGTGGCTCGGGCTAAA	
	Rv	CGGCCAACTTCGGACATG	
<i>glialcama</i>	Fw	CCCACCCACCAAGACTAAGC	
	Rv	CATCCTCAGTCGTGCTCATCTG	
<i>glialcamb</i>	Fw	AGACCGGATCTTGGTGTGTTGA	
	Rv	TAGGCTCATCCACAGTGAGATTGA	
<i>mlc1</i>	Fw	GCACGTTCAAGTGGACAACCTG	
	Rv	CACAATCATTGGGCCTTCAG	
<i>slc24a5</i>	oligo 1	TAGGTCTCTCGCAGGATGTTGC	
	oligo 2	AAACGCAACATCCTGCGAGAGA	
<i>clcn1a</i> exó 4	oligo 1	TAGGTCTGGGTCTCCTATCCCA	Generació gRNA
	oligo 2	AAACTGGGATAGGAGACCCAGA	
<i>clcn1b</i> exó 3		<b>TAATACGACTCACTATAGGGAGAGCTGAA</b> <b>GGGGAATGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC</b>	
<i>clcn1a</i> exó 4	Fw	CCTTCCCTGTATCCCTTAGCC	
	Rv	GCAGAGGGAAAGGTCAGACT	
<i>clcn1b</i> exó 3	Fw	ACAGCCATTCCATTTTCTCTC	Genotipat
	Rv	TGTTATGTGTTGTGGGCAGC	
<i>clcn1b</i> sa13816	Fw	TTTGTGGAGGACATCATGGTG	
	Rv	TTTCATGCAATGTTTTGTTTCA	

<i>cln1b</i> sa13816 TaqMan	Fw	TGGAGGACATCATGGTGAAGAAAAT	
	Rv	GTGGACTCCAGGAGATCTTTCAG	
	Sonda TaqMan	CTGTAAGTAGACT[G/A]AGGTGAC	
<i>cln1a</i> exó 5	Fw	TCTCCTATCCCATGGTGCTC	Evaluació <i>morpholinos</i>
	Rv	TGAACGTGGCAGCAAAGTAG	
<i>cln1b</i> exó 4	Fw	GTGCCAAGAGCATACAAGCA	
	Rv	CCCCAACAGCACATCCTACT	
<i>attB5 cln1b</i>	Fw	<u>GGGGACAACCTTTGTATACAAAAGTTGTG</u> ATGAATGGCGCGGTGTGGCGCC	
	Rv	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTA</u> CTATAACGGCTCCTCATCTCT	
<i>attB5 EGFP</i>	Fw	<u>GGGGACAACCTTTGTATACAAAAGTTGTG</u> ATGGTGAGCAAGGGCGAG	Clonació Gateway
<i>attB5 RFP</i>	Fw	<u>GGGGACAACCTTTGTATACAAAAGTTGTG</u> ATGGCCTCCTCCGAGGACGTCATCAAGG	
<i>attB2 polyA</i>	Rv	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTA</u> GGTACCGGGCCAATGCA	
<i>cln2a</i> exó 0a	Fw	TTGGAGGAGACAAGCAGACA	
<i>cln2a</i> exó 0b	Fw	GGAAGACATGACCCATGAGC	
<i>cln2a</i> exó 0c1	Fw	CCGCTGCATTCAAGGTTATG	
<i>cln2a</i> exó 0c2	Fw	AATTAATTCCCGCTGCATTC	
<i>cln2a</i> exó 2	Rv	AGAAGCCCCAGGAGGATAAG	
<i>cln2a</i> exó 5	Fw	GCTTAACTTGTGCCCTTGGA	Validació seqüències <i>cln2a</i>
<i>cln2a</i> exó 8	Rv	GAAGTTGCAGCGAAGAATC	
<i>cln2a</i> exó 15 1513	Fw	GGTCAAATCTCGCACATCCT	
<i>cln2a</i> exó 17 1944	Fw	CTTCACACCGGATTCACCTC	
<i>cln2a</i> exó 23 2433	Rv	GGACGCACCTTTACACCAGT	
<i>cln1a</i> 1139	Fw	CTCTCTTCCGCACCAACTTC	
<i>cln1a</i> 2053	Rv	AAGAGGTCGAGTCCAGCAAA	Hibridació
<i>cln2b</i> 391	Fw	GCGTGGGTCACTTATCCTGT	<i>in situ</i>
<i>cln2b</i> 1413	Rv	ACTTTCACCCACCAGACGAC	

**Taula 2.** Seqüències de tots els *primers* utilitzats indicant el gen i per a què s'han utilitzat.

# RESULTATS



**Capítol 1.**  
**Identificació i caracterització de CICs**  
**en el peix zebra**



## 1. Identificació de les proteïnes CLC en el genoma del peix zebra

Per tal d'identificar els gens *CLCN* homòlegs en el peix zebra, vam cercar en les bases de dades del NCBI i ENSEMBL. Sorprenentment, vam trobar tres gens ortòlegs a *CLCN2* enlloc de les habituals dues còpies. Els vam anomenar *clcn2a*, *clcn2b* i *clcn2c*. Presenta dos gens *CLCN1*, anomenats *clcn1a* i *clcn1b* i només un *CLCNK*, anomenat *clcnk* (Taula 3).

Gen	ENSEMBL ID	Cromosoma
<i>clcn1a</i>	ENSDARG00000062084	19
<i>clcn1b</i>	ENSDARG00000012269	16
<i>clcn2a</i>	ENSDARG00000062427	2
<i>clcn2b</i>	ENSDARG00000104550	Scaffold KN150171.1
<i>clcn2c</i>	ENSDARG00000060439	15
<i>clcnk</i>	ENSDARG00000022560	23

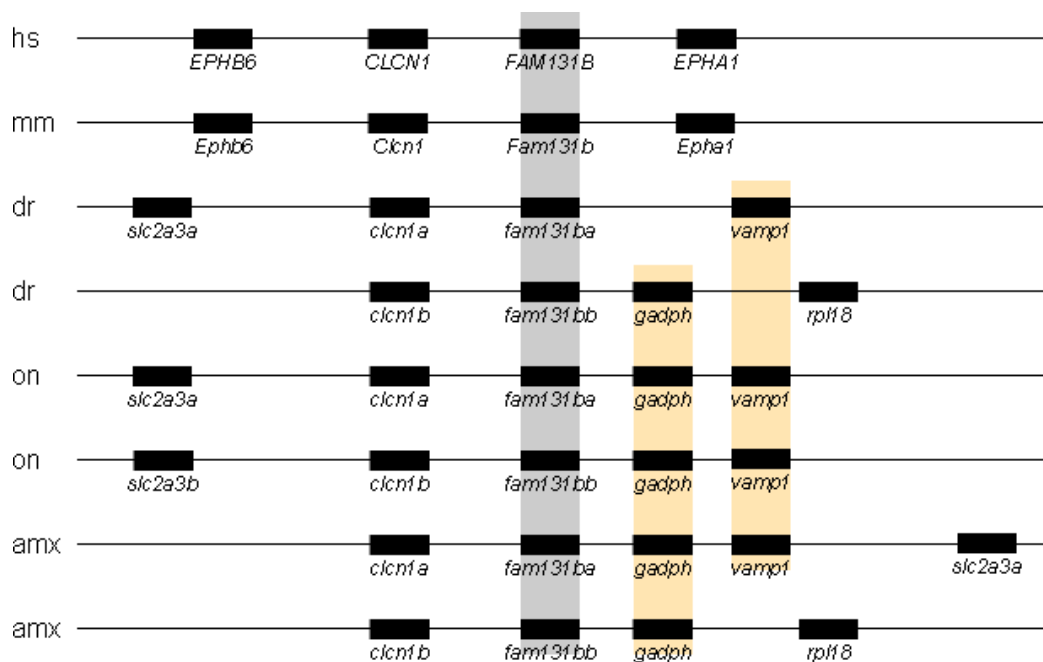
**Taula 3.** Gens *clc* del peix zebra. Es mostra el codi identificador de la base de dades ENSEMBL i el cromosoma en el que es localitza cadascun d'ells.

Posteriorment, vam realitzar un estudi de sintènia. Aquest terme s'utilitza per descriure la conservació de blocs de gens en un mateix cromosoma, de manera que si dos o més gens es localitzen al mateix cromosoma, es consideren sintènics (Myers, 2008). Durant el curs de l'evolució de les espècies, mutacions com les insercions o les translocacions, provoquen reorganitzacions cromosòmiques que alteren l'ordre gènic (Ehrlich et al, 1997; Ferguson-Smith i Trifonov, 2007). Des de la divergència de l'ancestre comú que ha donat lloc als teleostis (al qual pertany el peix zebra), degut a la duplicació del seu genoma és possible que s'hagin trencat algunes relacions sintèniques mentre que d'altres s'han preservat. Per aquesta raó, vam identificar i comparar la localització dels gens *clc* i altres gens en el mateix cromosoma d'humà, de ratolí, del peix zebra, de la tilapia del Nil i del tetra mexicà.

Pel gen *clcn1*, s'observa una forta sintènia entre mamífers, compartint tant la presència com l'ordre dels gens *EPHB6*, *CLCN1*, *FAM131B* i *EPHA1* (Figura 23). No obstant, aquesta relació es trenca en els teleostis, on només es conserva la presència del gen *clcn1* (duplicat donant lloc als gens *clcn1a* i *clcn1b*, en cromosomes separats) seguit del gen *fam131b*, el qual també es troba duplicat i ha donat lloc als gens *fam131ba* i *fam131bb*. En canvi, els teleostis han generat una nova forta relació sintènica entre ells. Es pot observar com tant el peix zebra com el tetra presenten el gen *vamp1* en el mateix cromosoma que *clcn1a* mentre que la tilapia presenta una duplicació addicional

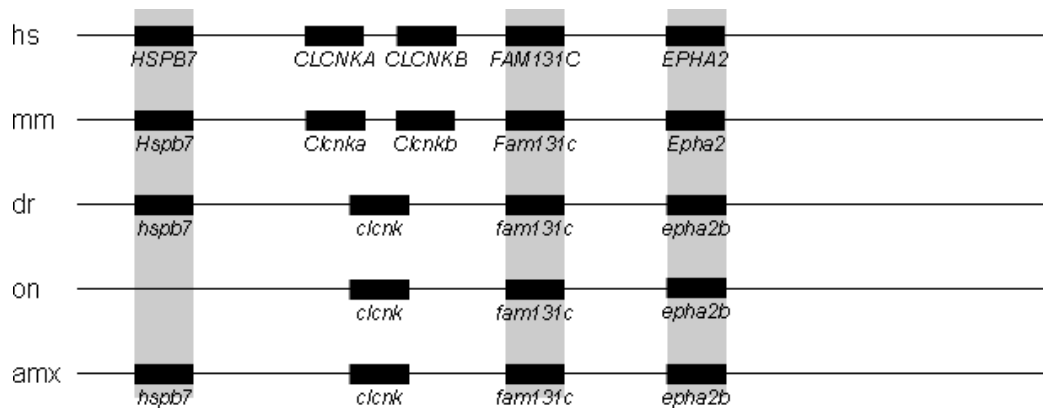


de *vamp1* i també es troba amb *clcn1b*. A més, el peix zebra presenta el gen *gadph* amb *clcn1b* mentre que en els altres dos teleostis es troba una còpia amb els dos paràlegs de *clcn1*. Addicionalment, la tilapia presenta una duplicació del gen *SLC2A3*, *slc2a3a* i *slc2a3b*, que es troben amb *clcn1a* i *clcn1b*, respectivament, mentre que el peix zebra i el tetra només presenten el gen *slc2a3a* en el mateix cromosoma que *clcn1a*. Curiosament, la posició del gen *slc2a3a* es dona *downstream* de *clcn1a*, a diferència de les dues espècies. Només el peix zebra i el tetra presenten el gen *rpl18* amb la mateixa regió que *clcn1b*.



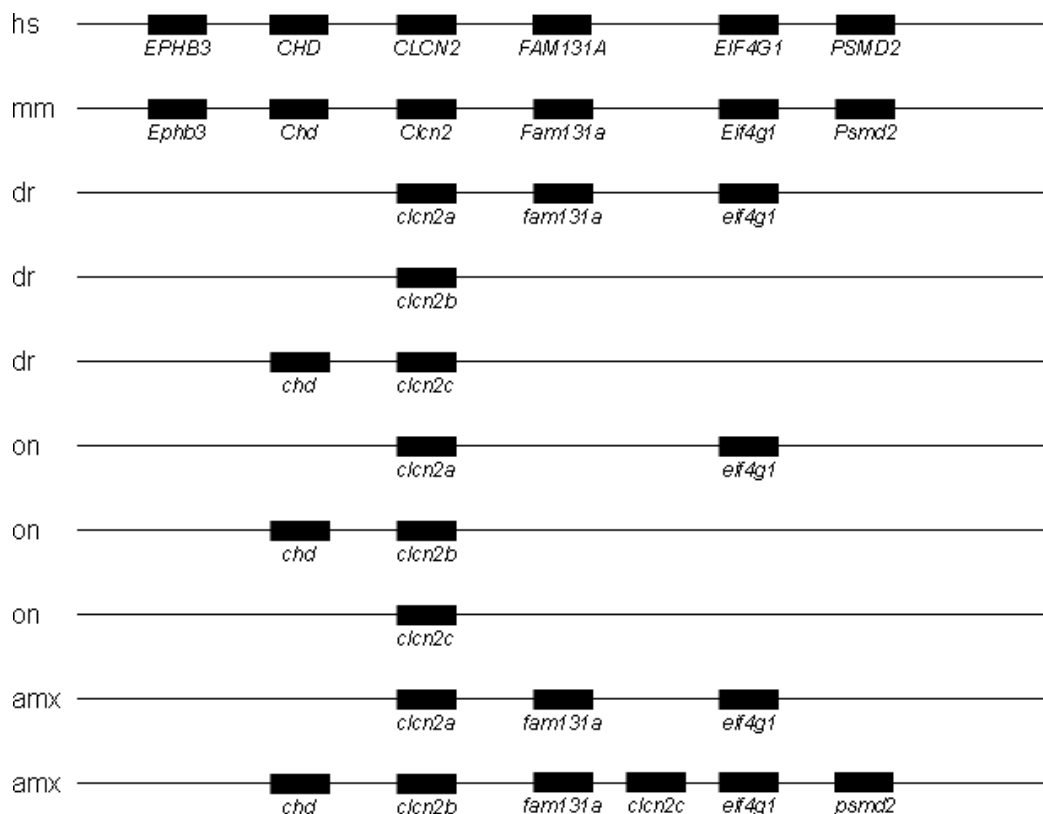
**Figura 23.** Localització cromosòmica dels gens *clcn1* en *hs* humà, *mm* ratolí, *dr* peix zebra, *on* tilapia del Nil, *amx* tetra mexicà. El rectangle gris mostra la relació sintènica entre mamífers i teleostis, on tots els paràlegs de *clcn1* dels teleostis també presenten una duplicació pel gen *fam131b*. Els rectangles taronges mostren la relació sintènica pròpia dels teleostis, compartint la localització cromosòmica dels gens *gadph*, *vamp1* i *slc2a3* amb *clcn1*. Només el peix zebra i el tetra presenten el gen *rpl18* juntament amb *clcn1b*.

Pels gens *clcnk*, en canvi, sí s'observa una forta sintènia (Figura 24) entre mamífers i teleostis. En aquest cas són els mamífers els que han patit la duplicació genòmica donant lloc als gens *CLCNKA* i *CLCNKB*, situats en tàndem. En els teleostis, el gen *epha2* també està duplicat, i el paràleg que es troba en la mateixa regió cromosòmica que *clcnk* és *epha2b*. Aquest no està identificat com a tal en la base de dades ENSEMBL ni NCBI pel peix zebra ni la tilapia (mentre que *epha2a* sí, pels tres teleostis). D'altra banda, tant el peix zebra com el tetra presenten el gen *hspb7* i resulta estrany que la tilapia no. Cercant a les bases de dades genòmiques, s'ha trobat una seqüència predita com a *hspb7* en el genoma de tilapia però no està mapejada en cap locus, de manera que no es pot establir que la sintènia sigui 100%, tot i que tampoc es pot descartar.



**Figura 24.** Localització cromosòmica dels gens *clcn* en *hs* humà, *mm* ratolí, *dr* peix zebra, *on* tilapia del Nil, *amx* tetra mexicà. El rectangle gris mostra la relació sintènica entre mamífers i teleostis, on tots els ortòlegs de *clcnk* dels teleostis es troben envoltats pels mateixos gens i en el mateix ordre que els mamífers. Degut a la duplicació genòmica dels teleostis, el paràleg *epha2b* es troba en la mateixa regió que *clcnk*.

En mamífers, *CLCN2* es troba rodejat pels gens *EPHB3*, *CHD*, *FAM131A*, *EIF4G1* i *PSMD2* (Figura 25). Aparentment tampoc s'observa cap relació sintènica amb mamífers i teleostis ni entre ells.



**Figura 25.** Localització cromosòmica dels gens *clcn2* en *hs* humà, *mm* ratolí, *dr* peix zebra, *on* tilapia del Nil, *amx* tetra mexicà. S'observa com no hi ha sintènia evident entre mamífers i els teleostis, ni entre ells tres. El gen *clcn2a* de peix zebra i tetra es localitzen amb els gens *fam131a* i *eif4g1*, mentre que el de tilapia només amb el gen *eif4g1*. El gen *clcn2b* de peix zebra es troba en un *scaffold* no assignat, el de tilapia localitza amb *chd* i en el genoma de tetra es troba present amb *chd*, *fam131a*, *clcn2c*, *eif4g1* i *psmd2*.

Els tres teleostis presenten tres paràlegs i cadascun presenta una ordre gènic diferent. Tant el peix zebra com el tetra presenten els gens *fam131a* i *EIF4G1* en el mateix cromosoma que *clcn2a*, mentre que la tilapia només presenta *EIF4G1*. El gen *clcn2b* de peix zebra es troba en un *scaffold* sense assignar i el de tilapia va acompanyat de *chd*, mentre que en el tetra va acompanyat de *chd*, *fam131a*, *clcn2c*, *EIF4G1* i *PSMD2*. En el cas del peix zebra, *chd* està localitzat juntament amb *clcn2c*.

En la següent taula es mostren els codis per cada gen *clc* utilitzat per l'estudi de sintènia (Taula 4):

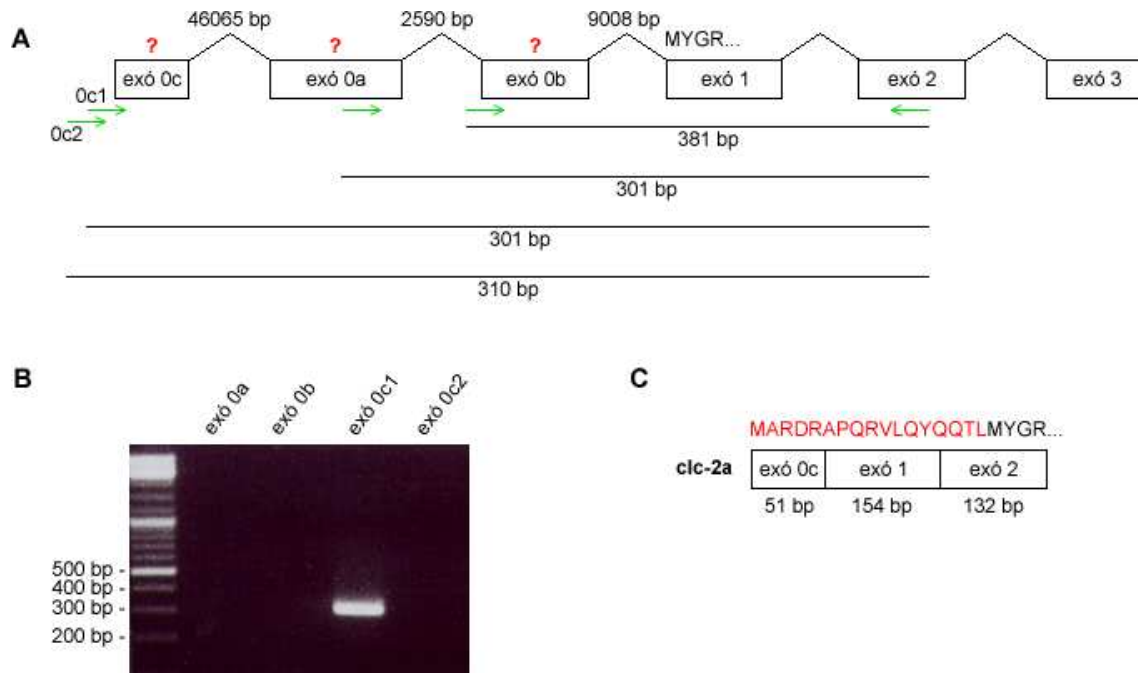
Gen	ENSEMBL ID	Gen	ENSEMBL ID
<i>CLCN1</i>	ENSG00000188037	on <i>clcn2a</i>	ENSONIG00000009832
<i>Clcn1</i>	ENSMUSG00000029862	on <i>clcn2b</i>	ENSONIG00000010801
dr <i>clcn1a</i>	ENSDARG00000062084	on <i>clcn2c</i>	LOC100699530*
dr <i>clcn1b</i>	ENSDARG00000012269	amx <i>clcn2a</i>	ENSAMXG00000019335
on <i>clcn1a</i>	ENSONIG00000007006	amx <i>clcn2b</i>	ENSAMXG00000011765
on <i>clcn1b</i>	ENSONIG00000012880	amx <i>clcn2c</i>	ENSAMXG00000011800
amx <i>clcn1a</i>	ENSAMXG00000009534	<i>CLCNKA</i>	ENSG00000186510
amx <i>clcn1b</i>	ENSAMXG00000019025	<i>CLCNKB</i>	ENSG00000184908
<i>CLCN2</i>	ENSG00000114859	<i>Clcnka</i>	ENSMUSG00000033770
<i>Clcn2</i>	ENSMUSG00000022843	<i>Clcnkb</i>	ENSMUSG00000006216
dr <i>clcn2a</i>	ENSDARG00000062427	dr <i>clcnk</i>	ENSDARG00000022560
dr <i>clcn2b</i>	ENSDARG00000104550	on <i>clcnk</i>	ENSONIG00000006556
dr <i>clcn2c</i>	ENSDARG00000060439	amx <i>clcnk</i>	ENSAMXG00000012509

**Taula 4.** Gens *clc* d'humà, ratolí, peix zebra (dr), tilapia del Nil (on) i tetra mexicà (amx). \* s'hi indica el codi NCBI ja que no presenta entrada en la base de dades ENSEMBL.

### 1.1 Validació de les seqüències obtingudes de les bases de dades

Tot i que el genoma del peix zebra està seqüenciat (Howe et al, 2013), no està completament anotat. Per això, gràcies a eines de predicció per homologia hem pogut identificar i aconseguir les seqüències tant genòmiques com de cDNA dels gens ortòlegs però és necessari validar-les. Vam observar diverses diferències entre les seqüències de *clcn2a* i *clcn2b* del NCBI i ENSEMBL. Cap de les dues bases de dades identificava el primer exó de *clcn2a*. L'ús de diversos programes de predicció d'exons (geneid, GeneScan) tampoc el van identificar en una regió de 100 kb *upstream* del primer exó predit. Per això, utilitzant el pèptid RALQYEQTL que es troba conservat en els CIC-2 tant d'humà com de ratolí i en *clc-2b*, vam realitzar un BLAST contra la regió genòmica corresponent. D'aquesta manera vam identificar un possible exó inicial

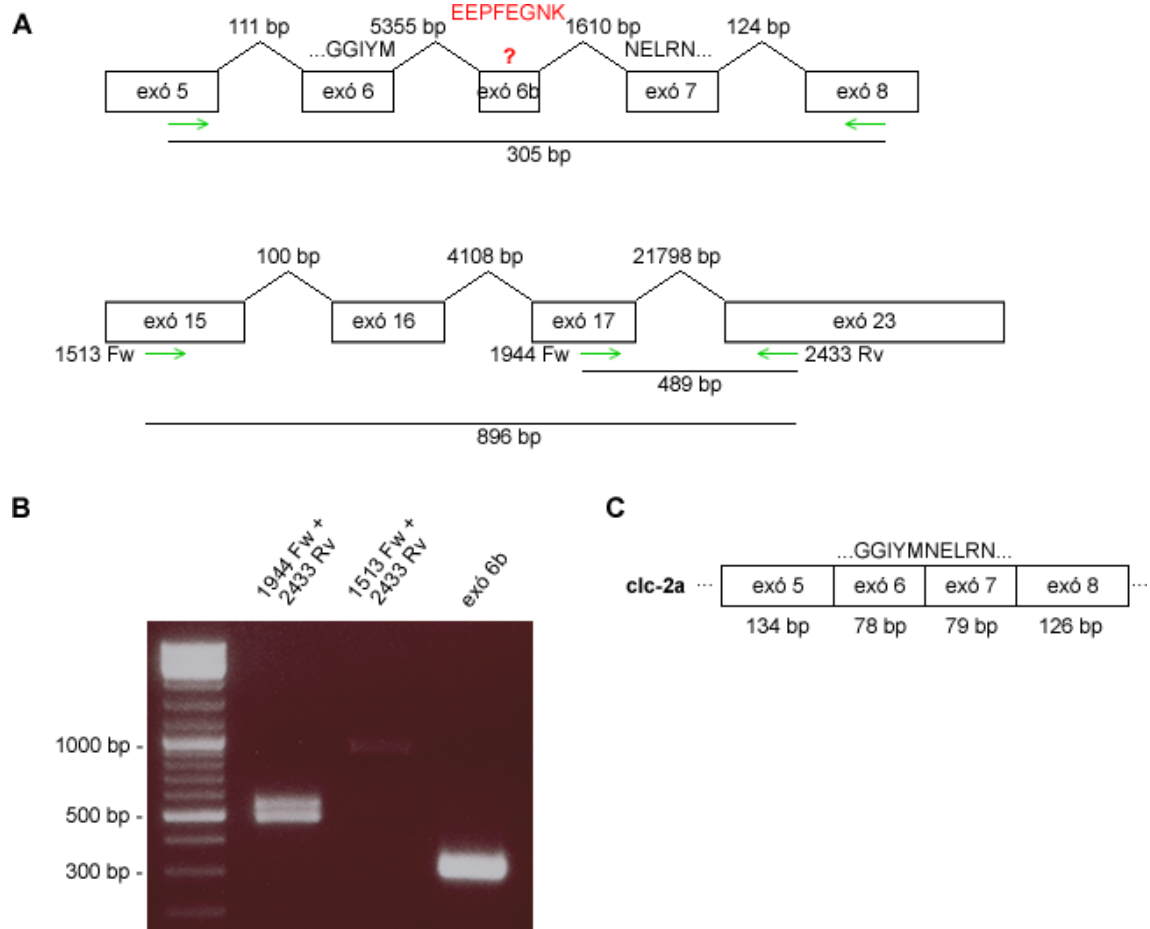
aproximadament a 58 kb de l'inici predit. Vam dissenyar quatre parells de *primers* per tal d'identificar la regió codificant mitjançant la tècnica de transcripció reversa (RT-PCR) i seqüenciació Sanger. A la figura 26A es mostra un esquema de les regions genòmiques identificades com a possible primer exó i els *primers* corresponents per amplificar aquestes regions.



**Figura 26.** Identificació del primer exó del gen *c1c2a*. **A** Representació de l'estructura genòmica on es mostren les tres possibles regions anomenades exó 0a, b i c. Les fletxes verdes indiquen les regions en les quals s'han dissenyat els *primers*. La seqüència MYGR sobre l'exó 1 és la seqüència inicial predita per les bases de dades NCBI i ENSEMBL. **B** RT-PCR on s'observa expressió només de la regió exó 0c1. **C** Representació del cDNA final incorporant el nou primer exó. En vermell s'indica la seqüència producte de l'exó 0c1.

En la figura 26B es mostra el resultat de les RT-PCR i s'observa expressió només de l'exó 0c1, el qual es va comprovar per seqüenciació. En la figura 26C es mostra un esquema amb la seqüència completada amb el primer exó recentment identificat. El següent conflicte que vam trobar va ser que la predicció del NCBI incorporava 600 aminoàcids al final de l'exó 19, els qual van ser descartats directament per no compartir homologia amb cap ClC. A més, presentava la inserció de sis aminoàcids VKTLPR a l'inici de l'exó 23, el qual no hem obtingut per RT-PCR. En canvi, la predicció de ENSEMBL presenta la inserció de vuit aminoàcids EEPFEGNK (anomenat exó 6b en la figura 27A) entre els exons 6 i 7 i no incorpora l'exó 20. En la part superior de la Figura 27A es mostra l'esquema de la regió genòmica i el parell de *primers* per tal d'esbrinar la presència de l'exó 6b, mentre que la part inferior de la mateixa figura mostra la regió genòmica per examinar la presència de l'exó 20. En la figura 27B es mostren les RT-PCR d'aquestes regions i al seqüenciar s'observa que l'exó 6b realment no existeix (Figura 27C). També es van seqüenciar les dues bandes

del producte de PCR 1944Fw + 2433 Rv i vam veure que l'exó 20 és realment un exó alternatiu.



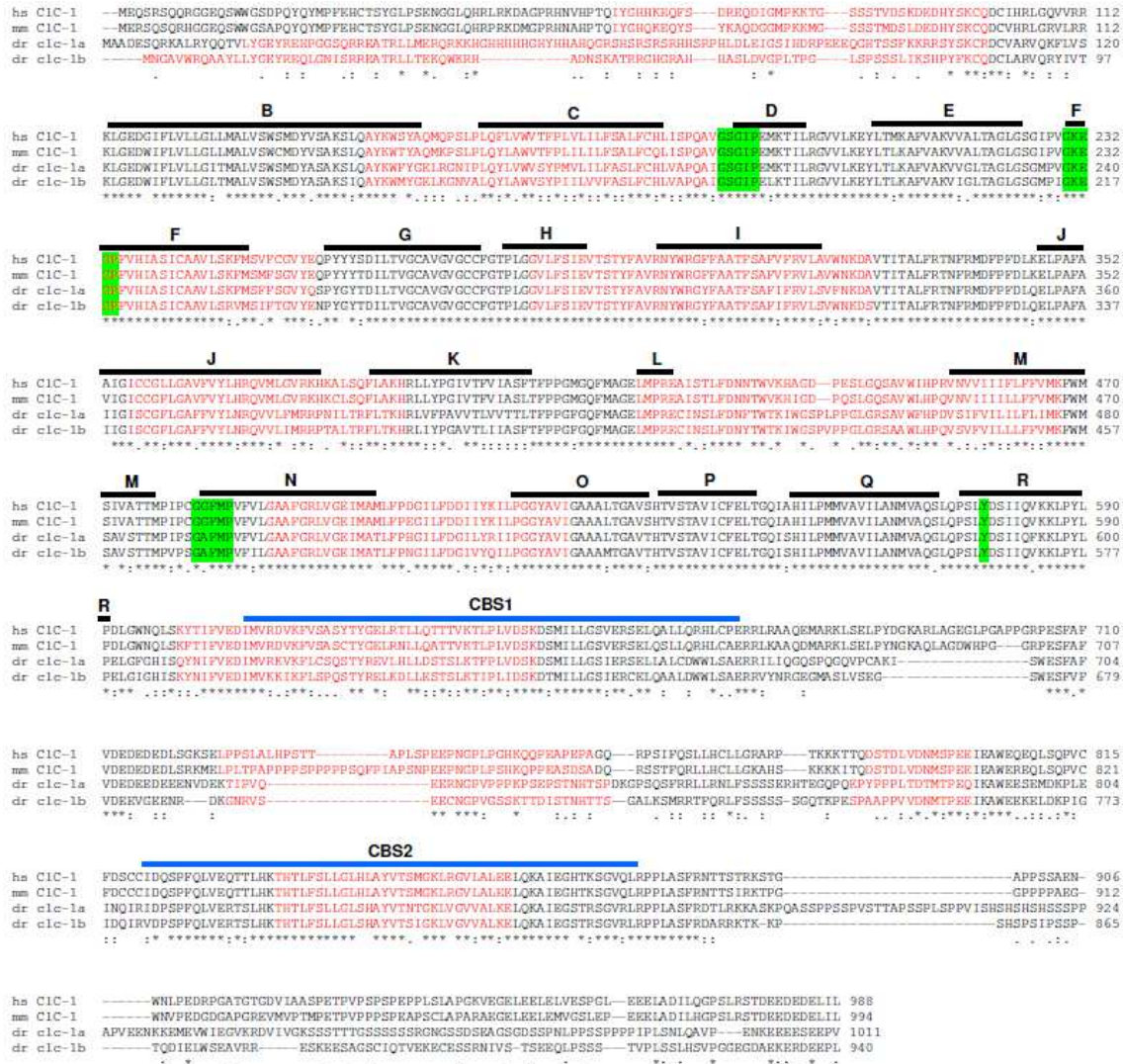
**Figura 27.** Validació dels exons 6b i 20 de *cln2a*. **A** Representació de la seqüència genòmica on es mostren les possibles seqüències pels exons 6b (superior) i 20 (inferior). Les fletxes verdes indiquen les regions en les quals s'han dissenyat els primers. La seqüència EEPFEGNK sobre l'exó 6b és la seqüència predita per la base de dades ENSEMBL, mentre que les seqüències en negre pertanyen al final de l'exó 6 i a l'inici de l'exó 7. **B** RT-PCR on s'observa expressió dels tres fragments. D'especial interès és la doble banda resultant de 1944 Fw + 2433 Rv. **C** Representació del cDNA final sense l'exó 6b.

Respecte les seqüències de *cln2b*, només la predicció de ENSEMBL identificava correctament el primer exó. En canvi, la seqüència del NCBI presentava una inserció de quatre aminoàcids al principi de l'exó 8, els exons 9-12 no hi eren i els exons 16 i 17 no presenten un correcte *splicing*. En canvi, presenta un exó 20 que no hem estat capaços de trobar per RT-PCR al amplificar aquesta regió per generar una sonda d'hibridació *in situ*. No obstant, degut a la seva alta conservació no podem descartar que sigui *splicing* alternatiu.

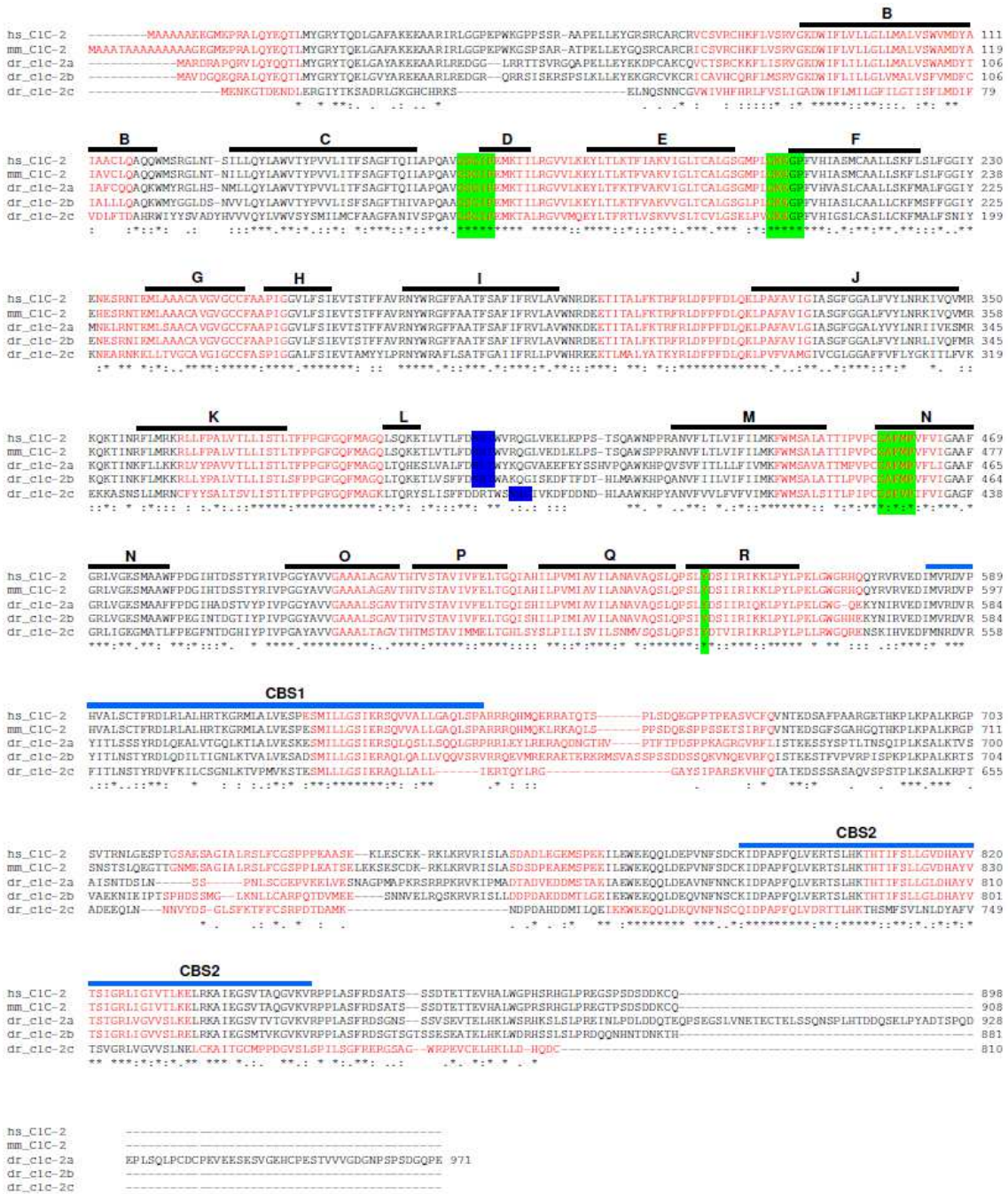
Finalment, vam seqüenciar-los tots per obtenir el cDNA complet i els vam obtenir per síntesi gènica.

## 1.2 Comparació de seqüències i anàlisi filogenètic

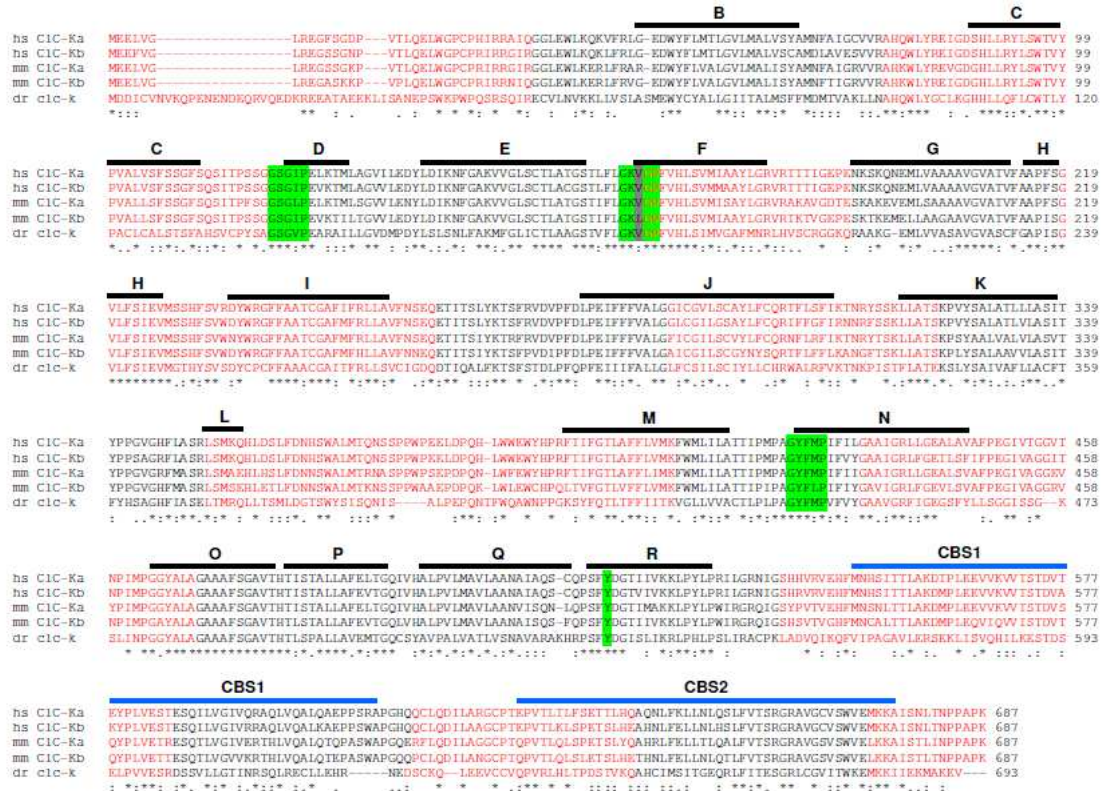
Un cop teníem totes les seqüències corregides vam realitzar alinaments múltiples per *clc-1*, *clc-2* i *clc-k* (Figura 28, 29 i 30, respectivament) s'observa que els límits exó-intró estan conservats entre els CIC de mamífer i del peix zebra.



**Figura 28.** Aliniament de les seqüències de ClC-1 corresponents a les proteïnes humanes, de ratolí i de peix zebra. Les  $\alpha$ -hèlix s'indiquen amb una línia negra seguint la nomenclatura de Dutzler et al, 2002. Els dominis CBS s'indiquen amb una línia blava. Els residus implicats en la selectivitat al clorur estan ressaltats en verd. Els exons s'indiquen alternant els colors negre i vermell. Els asteriscs indiquen residus idèntics entre les proteïnes alinades, dos punts indiquen residus conservats, els punts indiquen residus similars.



**Figura 29.** Aliniament de les seqüències de CIC-2 corresponents a les proteïnes humanes, de ratolí i de peix zebra. Les  $\alpha$ -hèlix s'indiquen amb una línia negra seguint la nomenclatura de Dutzler et al, 2002. Els dominis CBS s'indiquen amb una línia blava. Els residus implicats en la selectivitat al clorur estan ressaltats en verd. La seqüència consens de glicosilació està ressaltada en blau. Els exons s'indiquen alternant els colors negre i vermell. Els asteriscs indiquen residus idèntics entre les proteïnes aliniades, *dos punts* indiquen residus conservats, els *punts* indiquen residus similars.



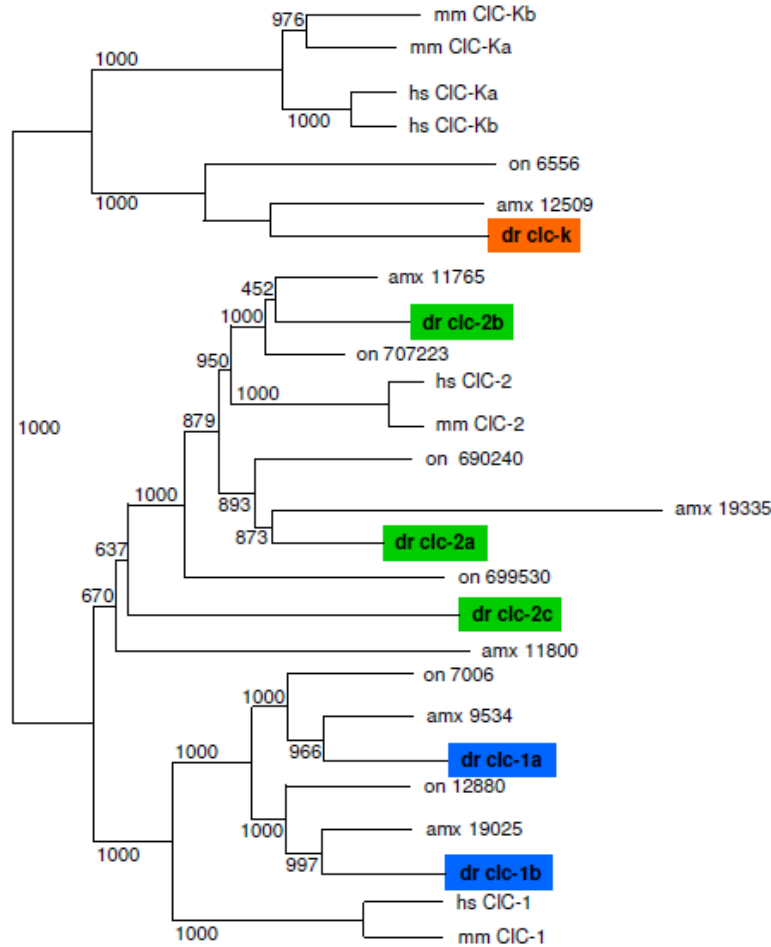
**Figura 30.** Aliniament de les seqüències de CIC-K corresponents a les proteïnes humanes, de ratolí i de peix zebra. Les  $\alpha$ -hèlix s'indiquen amb una línia negra seguint la nomenclatura de Dutzler et al, 2002. Els dominis CBS s'indiquen amb una línia blava. Els residus implicats en la selectivitat al clorur estan ressaltats en verd. En gris s'ha ressaltat el residu que substitueix al *gating glutamate*, valina en tots els CIC-K, excepte en el CIC-Kb de ratolí que presenta una leucina. Els exons s'indiquen alternant els colors negre i vermell. Els asteriscs indiquen residus idèntics entre les proteïnes aliniades, *dos punts* indiquen residus conservats, els *punts* indiquen residus similars.

És important destacar l'alta similitud en les regions corresponents a les  $\alpha$ -hèlix intramembrana, els dominis CBS intracel·lulars i les regions implicades en la selectivitat al clorur. És important destacar la presència d'una valina, o leucina en el cas de CIC-Kb de ratolí, en les proteïnes CIC-K en la posició del *gating glutamate*, residu responsable de la dependència de voltatge dels canals CIC. A més, mentre que les proteïnes CIC-1 i CIC-2 presenten un *loop* de 151 i 145 aminoàcids entre els dos dominis CBS respectivament, el *loop* de les proteïnes CIC-K és molt més petit i està conservat tant en mamífers com en el peix zebra, sent només de 18 aminoàcids.

Posteriorment, vam realitzar un anàlisi filogenètic juntament amb les proteïnes humana, de ratolí i de dos peixos d'aigua dolça que pertanyen a la mateixa família de teleostis que el peix zebra, la tilàpia del Nil i el tetra mexicà. Així podem assegurar que els gens identificats es corresponen amb els seus ortòlegs. Vam realitzar un aliniament múltiple amb el programa CLUSTALW, un anàlisi *bootstrap* amb 1000 replicats i finalment vam obtenir l'arbre filogenètic amb el programa NJ plot (Figura 31). S'observa com cada grup de paràlegs forma *clusters* amb els seus ortòlegs. És



interessant destacar que el *clc-2c*, tot i ser un fenomen de duplicació gènica exclusiu de peixos d'aigua dolça, continua agrupant-se amb *CIC-2*.



**Figura 31.** Anàlisi filogenètic dels canals CIC de membrana. S'observa la triplicació de *CLCN2* (ressaltats en verd), fenomen que es dona també en les altres dues espècies de teleosts, la duplicació de *CLCN1* (ressaltats en blau) i la presència d'un sol *CLCNK* (ressaltat en taronja). *hs* humana, *mm* ratolí, *dr* peix zebra (*Danio rerio*), *amx* tetra mexicana (*Astyanax mexicanus*), *on* tilàpia del Nil (*Oreochromis niloticus*). Les seqüències utilitzades són ENSG00000186510, ENSG00000184908, ENSG00000114859 i ENSG00000188037 per l'humà; ENSMUSG00000033770, ENSMUSG00000006216, ENSMUSG00000022843 i ENSMUSG00000029862 pel ratolí; ENSAMXG00000012509, ENSAMXG00000011765, ENSAMXG00000011800, ENSAMXG00000019335, ENSAMXG0000009534 i ENSAMXG00000019025 pel tetra mexicà; ENSONIG00000006556, LOC100690240, LOC100699530, LOC100707223, ENSONIG00000007006 i ENSONIG00000012880 per la tilàpia del Nil. Els números representen els valors del *bootstrap*.

## 2. Patró d'expressió dels canals CIC

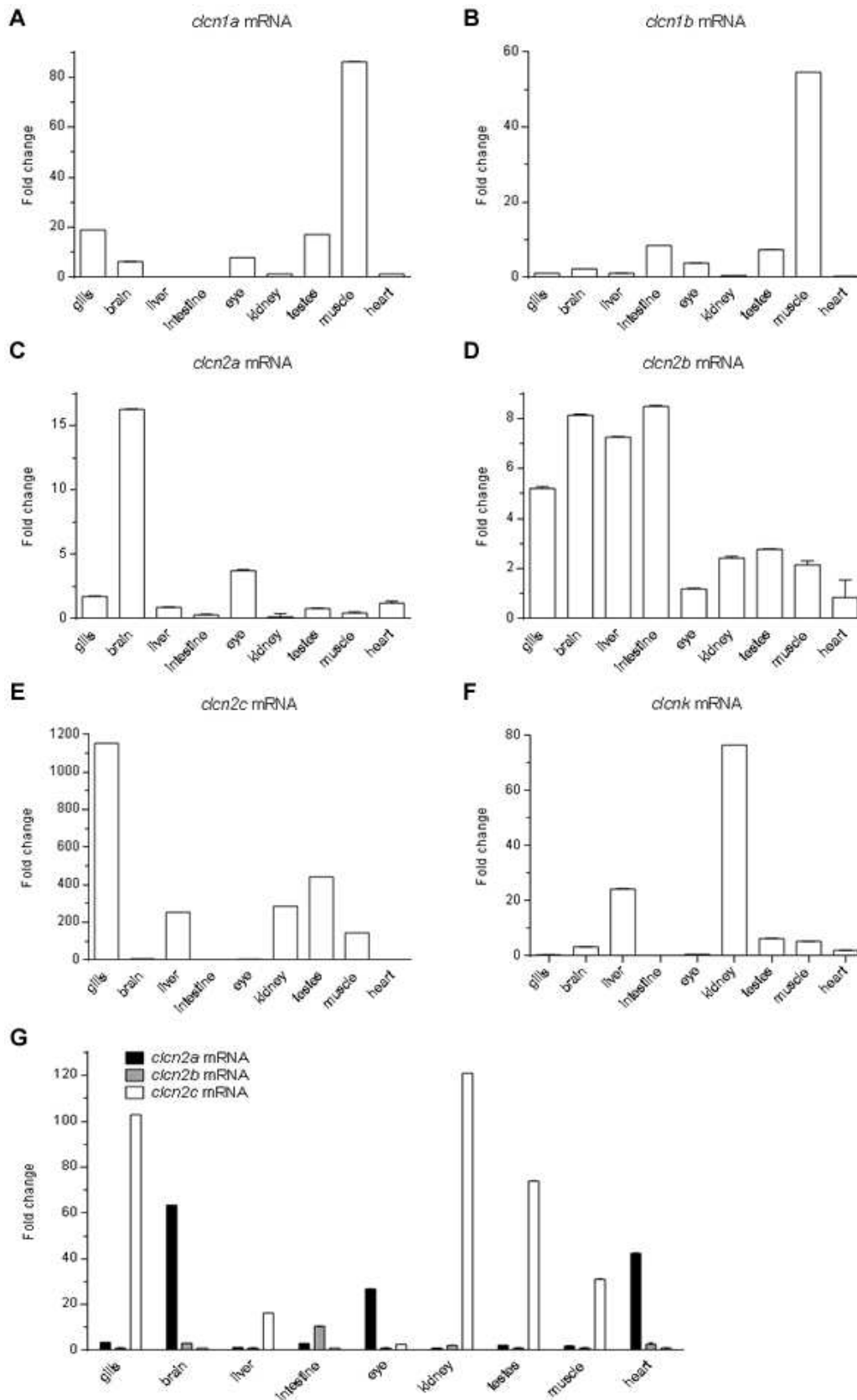
Per aprofundir més en la caracterització dels ortòlegs del peix zebra, es van realitzar experiments d'expressió gènica. En el següent apartat es presenten els resultats obtinguts en teixits adults i durant el desenvolupament embrionari.

### 2.1 Expressió dels canals CIC en teixits adults

S'ha demostrat que la conservació de gens duplicats sovint comporta la seva subfuncionalització, com podria ser la restricció del patró d'expressió de cada gen

duplicat (Force et al, 1999; Li et al, 2005). Aquest fet seria plausible en el cas de CIC-2, el qual s'expressa en diversos teixits. Vam analitzar l'expressió del mRNA dels dos *clcn1*, dels tres gens *clcn2* i de *clcnk* utilitzant els gens *rpl13a* i *ef1a* com a controls endògens (Figura 32). Es mostren els nivells relatius de mRNA de cada gen agafant com a referència el teixit amb menor expressió (així doncs, els nivells de *clcn1a* es mostren respecte els nivells de l'intestí, *clcn1b* respecte el cor, *clcn2a* respecte els ronyons, *clcn2b* respecte el cor, *clcn2c* respecte el cor i *clcnk* respecte l'intestí) tenint en compte l'eficiència de cada parella de primers seguint el mètode Pfaffl (Pfaffl, 2001).

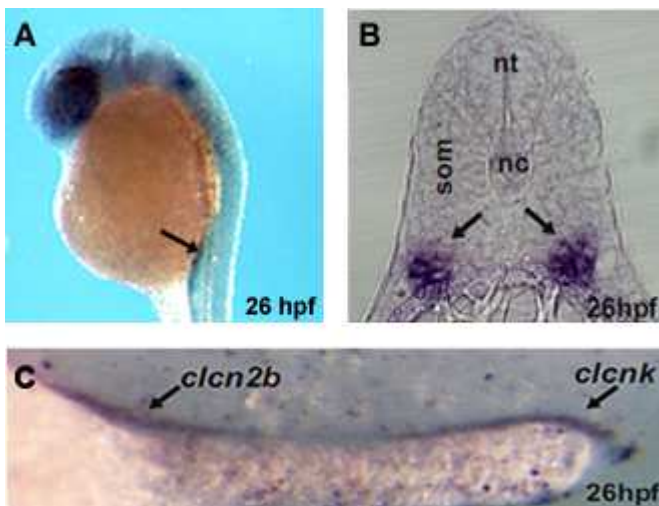
Efectivament, els tres gens *clcn2* presenten un patró diferent entre ells. Es pot observar com *clcn2a* és el més predominant en el cervell i en l'ull (Figura 32C), mentre que *clcn2b* presenta un patró més ampli (Figura 32D) i *clcn2c* és especialment abundant en les brànquies (Figura 32E). Comparant els nivells d'expressió dels tres gens en cada teixit (Figura 32G), es fa evident que *clcn2a* és el més abundant en el cervell, l'ull i el cor; *clcn2b* en l'intestí i *clcn2c* en les brànquies, el ronyó, els testicles, el fetge i el múscul. Aquests resultats són compatibles amb el fenomen de subfuncionalització, de manera que *clcn2a* es troba enriquit en teixits d'alta activitat elèctrica, *clcn2b* s'expressa ubíquament com CIC-2 en mamífers mentre que *clcn2c* és el més abundant en els teixits on es dona un intercanvi iònic amb el medi extern, com les brànquies i el ronyó. Podem observar que tant *clcn1a* com *clcn1b* s'expressen predominantment en el múscul esquelètic (Figura 32A i B, respectivament). És important destacar l'absència de transcrit en teixit cardíac, demostrant que els canals *clcn-1* també són específics de múscul esquelètic de la mateixa manera que en mamífers. El mRNA de *clcnk* es detecta principalment al ronyó, tot i que també s'observa certa expressió al fetge (Figura 32F).



**Figura 32.** Expressió gènica de *clcn1a* (A), *clcn1b* (B), *clcn2a* (C), *clcn2b* (D), *clcn2c* (E) i *clcnk* (F). En la G es mostra l'abundància relativa dels *clcn2* en cada teixit. S'observa com *clcn1a* i *clcn1b* són més abundants en el múscul (A i B, respectivament). *clcn2a* és més abundant en cervell i ull (C), *clcn2b* presenta un patró ubic (D), *clcn2c* predomina en les brànquies (E) i *clcnk* presenta alt nivells en ronyó (F). En G s'observa la restricció d'expressió tissular dels gens *clcn2*, predominant *clcn2a* en teixits excitable com el cervell, l'ull i el cor; mentre que *clcn2b* s'expressa ubíquament i *clcn2c* abunda en els teixits on es dona un intercanvi iònic amb el medi extern, com les brànquies i el ronyó. Es mostra la mitjana  $\pm$  SEM (n=4).

## 2.2 Expressió dels canals CIC en diferents estadis embrionaris

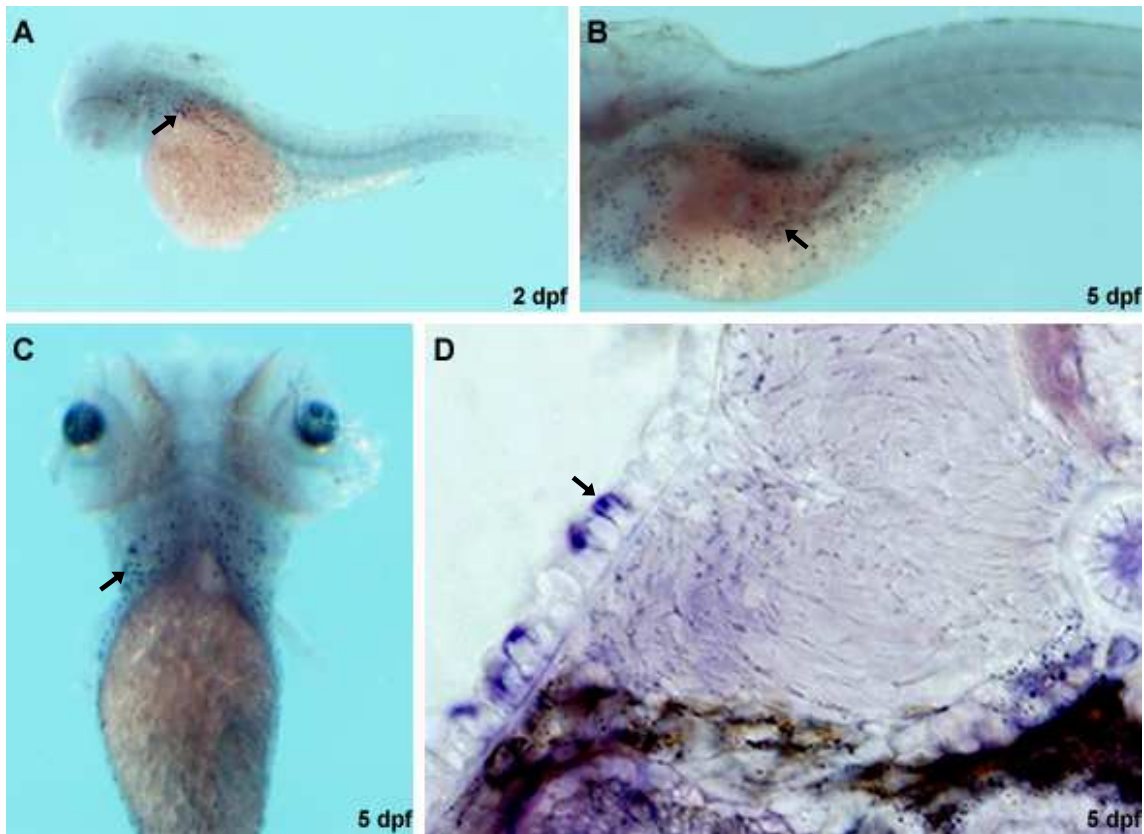
Per estudiar el patró d'expressió en embrions vam utilitzar la tècnica d'hibridació *in situ* en diferents estadis de desenvolupament: 1, 2, 3 i 5 dies post-fertilització (dpf). Vam clonar fragments d'1 kb, tant de la regió codificant com de la regió 3' UTR, de cadascun dels gens per generar sondes de RNA antisentit marcades amb digoxigenina per la seva posterior detecció. Per *clcn2a* no vam ser capaços de detectar senyal en cap dels estadis analitzats, només s'observa una tinció difosa en tot l'embrió. Per contra, la *in situ* de *clcn2b* presenta una senyal clarament localitzada al pronefros a partir de les 26 hpf (Figura 33A i B). Realitzant una hibridació *in situ* doble amb *clcnk*, que ja se sap que s'expressa en la regió distal del pronefros (Wingert et al, 2007), hem pogut identificar que la regió on s'expressa *clcn2b* pertany al túbul contornejat proximal (Figura 33C).



**Figura 33.** Hibridació *in situ* de *clcn2b* en embrions. **A** S'observa expressió de *clcn2b* en el pronefros a les 26 hpf (indicat amb una fletxa negra). **B** Secció transversal on s'observa marcatge bilateral a nivell del pronefros (indicat amb dues fletxes negres). **C** Hibridació *in situ* doble de *clcn2b* i *clcnk* identifica la regió on s'expressa el primer com al segment contornejat proximal. *som* somites, *nt* tub neural, *nc* notocorda.

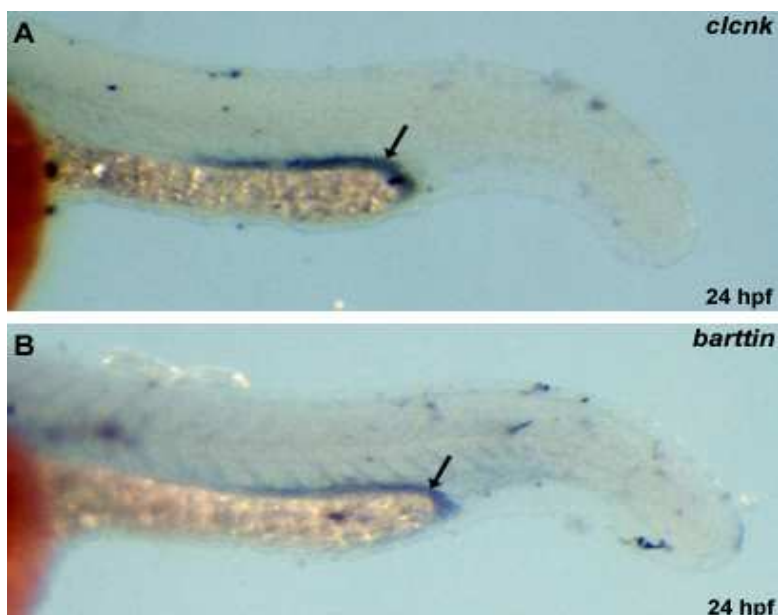
La tinció de *clcn2c*, comença a presentar senyal a partir dels 2 dpf en cèl·lules aïllades en la superfície de l'embrió, cap a la part posterior del cap i per sobre del sac vitel·lí (Figura 34A).

Les cèl·lules marcades incrementen en nombre i en extensió durant el tercer i els següents dies de desenvolupament, expandint-se per sobre del sac vitel·lí fins a recobrir-lo completament. Als 5 dpf, també s'observen cèl·lules positives per *clcn2c* en la part inferior del cap, a la regió corresponent als arcs branquials (Figura 34B i C). A més, les brànquies es formaran en aquesta regió, consistent amb l'alta expressió de *clcn2c* en les brànquies en l'animal adult. Seccions d'aquests embrions ens han permès identificar que les cèl·lules marcades estan restringides a la pell de l'embrió (Figura 34D). Aquest patró d'expressió és coherent amb que aquestes cèl·lules són ionòcits, un tipus de cèl·lules de la pell especialitzats en la homeòstasi iònica en els teleostis (Lin et al, 2006).



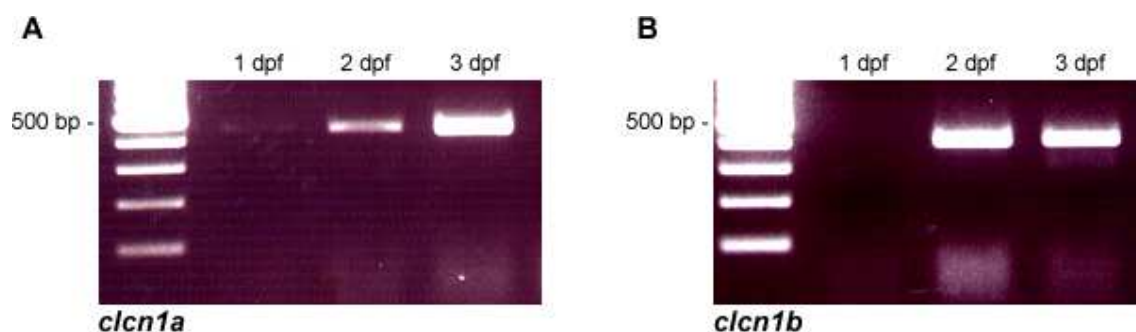
**Figura 34.** Hibridació *in situ* de *cln2c* en embrions. **A** A 2 dpf s'observa marcatge de *cln2c* a la part posterior del cap i per sobre del sac vitel·lí (fletxa). Aquest marcatge incrementa en nombre de cèl·lules positives i extensió fins els 5 dpf (**B**) arribant als arcs branquials, indicat amb la fletxa (**C**). **D** Secció transversal on s'observa que les cèl·lules positives de *cln2c* es troben a la pell.

L'expressió de *clcnk* és evident a partir de 1 dpf i s'observa un marcatge en la regió distal del pronefros (Figura 35A). A més, aquesta coincideix amb la senyal obtinguda per la seva subunitat obligatòria, *barttin* (Figura 35B). Tot i que en mamífers *CLCKNA*, *CLCKNB* i *BARTTIN* també s'expressen en l'oïda interna, no hem detectat senyal en aquesta regió en cap estadi analitzat.



**Figura 35.** Hibridació *in situ* de *clcnk* en embrions. L'expressió de *clcnk* (**A**) i *barttin* (**B**) es restringeix al segment distal del pronefros.

En el cas dels *clcn1*, tampoc vam poder detectar senyal en cap dels estadis analitzats. Per aquesta raó, vam decidir seguir una altra aproximació per saber a partir de quin moment es comencen a expressar. Mitjançant la tècnica de RT-PCR sabem que *clcn1a* (Figura 36A) s'expressa a partir de 1 dpf i els nivells de mRNA incrementen fins els 3 dpf, mentre que *clcn1b* (Figura 36B) comença a expressar-se a partir dels 2 dpf i es manté als 3 dpf.



**Figura 36.** RT-PCR a partir de RNA total d'embrions de 1, 2 i 3 dpf. **A** *clcn1a* comença a expressar-se a partir de 1 dpf i incrementa fins als 3 dpf. **B** *clcn1b* comença a expressar-se a partir de 2 dpf i es manté als 3 dpf.

### 3. Generació d'anticossos contra les proteïnes de peix zebra

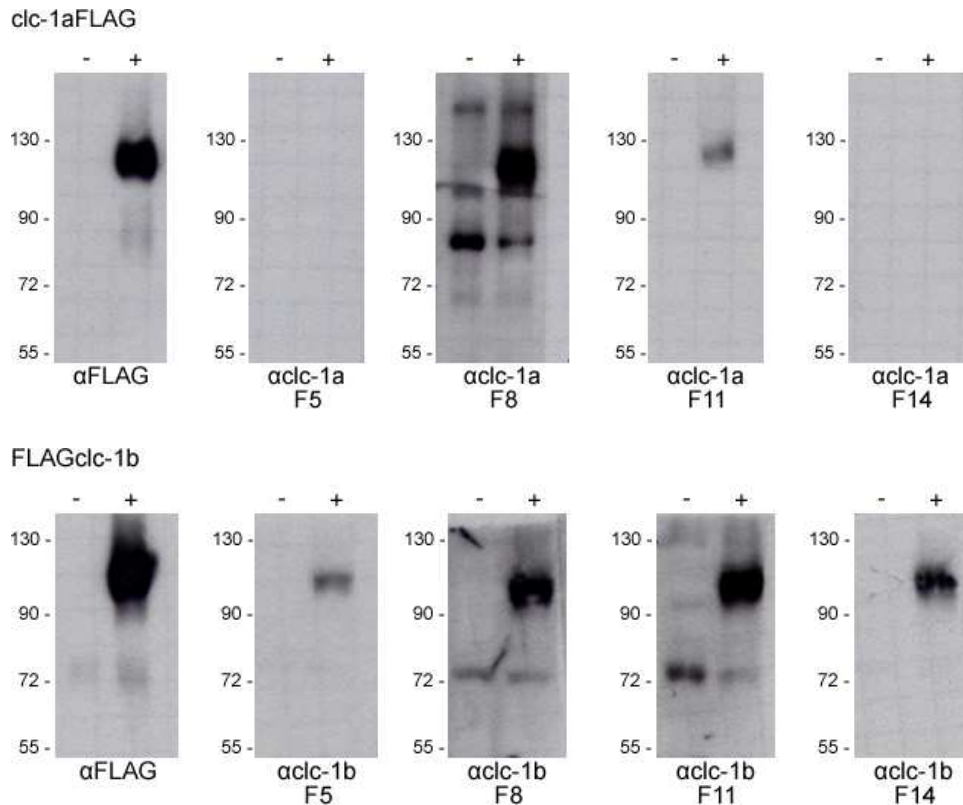
Els anticossos són en una eina essencial per l'estudi d'expressió i localització de proteïnes. Per aquest motiu i davant la manca de disponibilitat d'anticossos comercials contra les proteïnes d'estudi d'aquesta tesi, part del treball ha estat el desenvolupament i la posterior validació d'anticossos policlonals. En la Taula 5 s'indica la seqüència del pèptid (o pèptids, en algú cas) utilitzada com a epítop per la generació dels anticossos.

Proteïna	Seqüència pèptid	Posició aminoàcids
clc-1a	H <sub>2</sub> N-CQAVPENKEEEEESEEPV-COOH	996-1011
clc-1b	H <sub>2</sub> N-CPGGEGDAEKERDEEPL-COOH	925-940
clc-2a	H <sub>2</sub> N-ELPYADTSPQDEPLS-CONH <sub>2</sub>	918-932
	H <sub>2</sub> N-VVGDGNPSPSDGQPE-COOH	957-971
clc-2b	H <sub>2</sub> N-LPRDQQNHNTDNKTH-COOH	867-881
clc-k	H <sub>2</sub> N-ENENDEQRVQEDKREEC-CONH <sub>2</sub>	12-27
barttin	H <sub>2</sub> N-CRPDPNREMYGGRVKDS-CONH <sub>2</sub>	150-165

**Taula 5.** Seqüències dels pèptids per la generació dels anticossos corresponents. També s'indica la posició dels aminoàcids dels pèptids seleccionats.

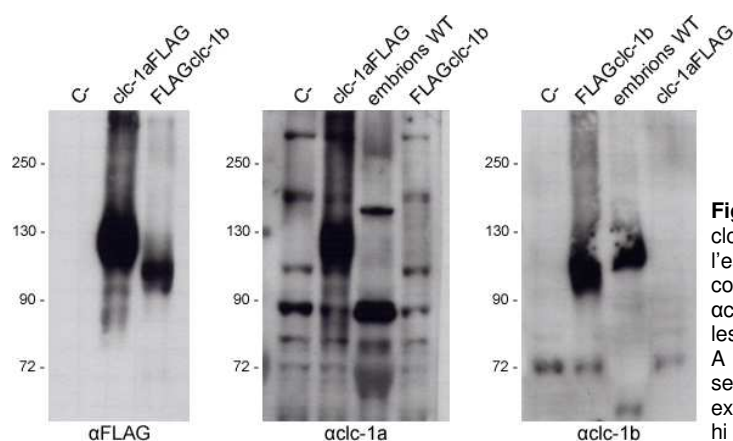
### 3.1 Anticossos contra les proteïnes clc-1a i clc-1b

Com és habitual en aquest procediment, s'immunitzen dos conills per cada anticòs a generar. En el moment que vaig arribar al laboratori ja s'havia triat el millor sèrum per cada clc-1, el clc-1a 895 i el clc-1b 149. Vam purificar ambdós sèrums i es van testar les diferents fraccions per Western blot (Figura 37).



**Figura 37.** Fraccions dels anticossos generats contra clc-1a i clc-1b. “-” indica cèl·lules sense transfectar. “+” indica cèl·lules transfectades amb el clc-1 corresponent i indicat a la part superior. La fletxa indica la banda corresponent al clc-1a i clc-1b, respectivament.

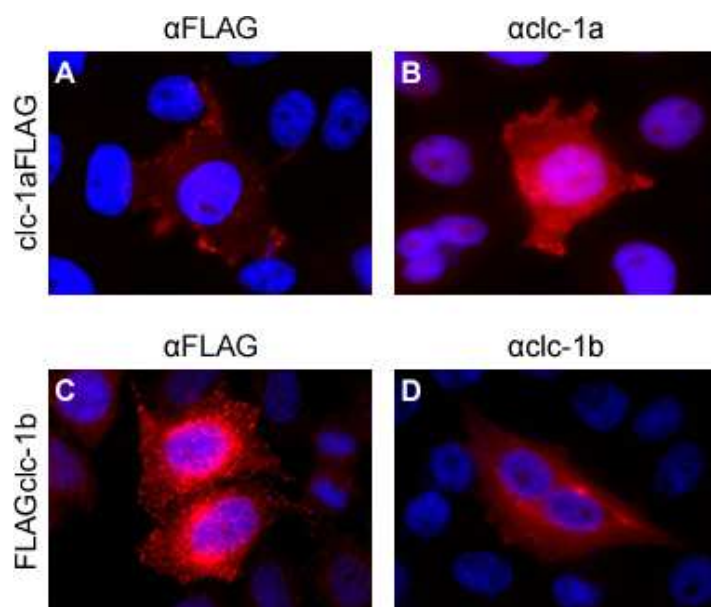
Utilitzant cèl·lules sense transfectar com a control negatiu i l'anticòs FLAG com a control positiu, som capaços de discriminar la senyal positiva amb el pes corresponent a clc-1 (112 kDa per clc-1a i 103 kDa per clc-1b). L'objectiu d'aquests anticossos és el d'utilitzar-los en teixit dels peixos. Per això, un cop ajuntades les fraccions que presenten més concentració d'anticòs, es va realitzar un Western blot amb mostres d'embrions per tal de veure si detectaven la proteïna en les mostres d'interès (Figura 38).



**Figura 38.** Detecció de les proteïnes clc-1a i clc-1b per western blot. Al panell de l'esquerre es mostra la detecció amb  $\alpha$ FLAG com a control positiu. Al mig, la detecció amb  $\alpha$ clc-1a presenta senyal positiva només en les cèl·lules que expressen el mateix canal. A la dreta, la detecció amb  $\alpha$ clc-1b presenta senyal positiva només en les cèl·lules que expressen el mateix canal. S'observa que no hi ha detecció creuada entre els dos clc-1.

En el marcatge amb  $\alpha$ clc-1a no s'observa senyal en embrions, només inespecificitats. La detecció amb  $\alpha$ clc-1b no presenta tantes inespecificitats i es veu senyal en embrions, tot i que al presentar un pes lleugerament superior es podria tractar de senyal inespecífica. A més, també s'observa com no hi ha senyal creuada, és a dir, l'anticòs contra clc-1a no detecta la proteïna clc-1b i viceversa.

Posteriorment, vam comprovar que l'anticòs funcionés també en immunofluorescència en cèl·lules HeLa (Figura 39).



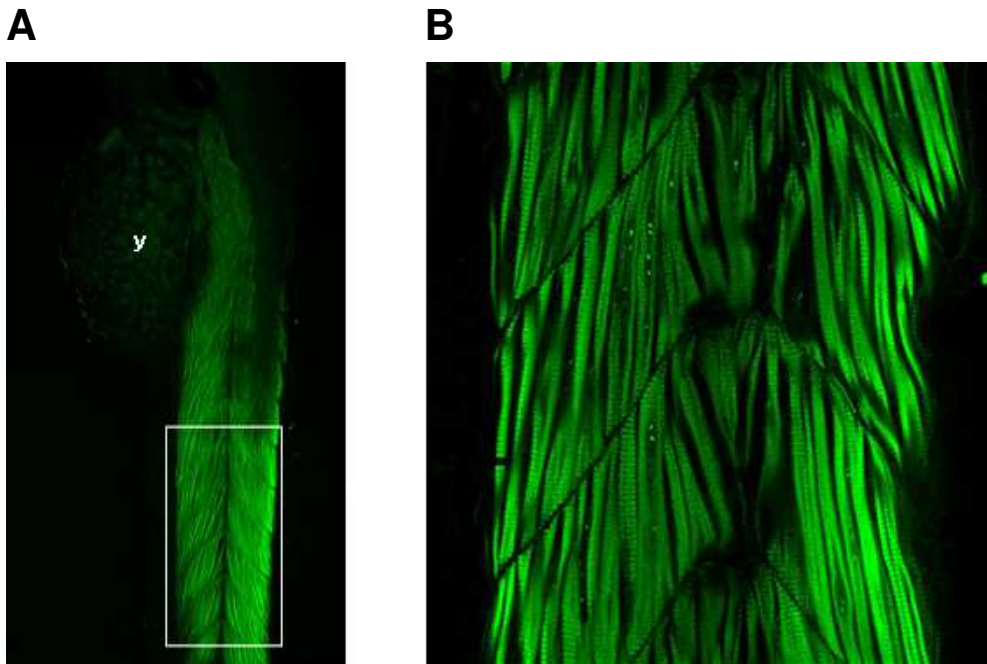
**Figura 39.** Detecció de les proteïnes clc-1a (A-B) i clc-1b (C-D) per immunofluorescència. En els panells A i C es mostra la localització detectant amb  $\alpha$ FLAG de clc-1a i clc-1b, respectivament. En B i D es mostra la localització mitjançant la detecció amb  $\alpha$ clc-1a i  $\alpha$ clc-1b, respectivament.

Efectivament, els anticossos detecten les proteïnes. És interessant destacar que el marcatge per clc-1a (Figura 39A i B), tant amb  $\alpha$ FLAG com amb  $\alpha$ clc-1a, mostra senyal en la membrana plasmàtica de les cèl·lules, mentre que el marcatge per clc-1b (Figura 39C i D) mostra senyal intracel·lular.



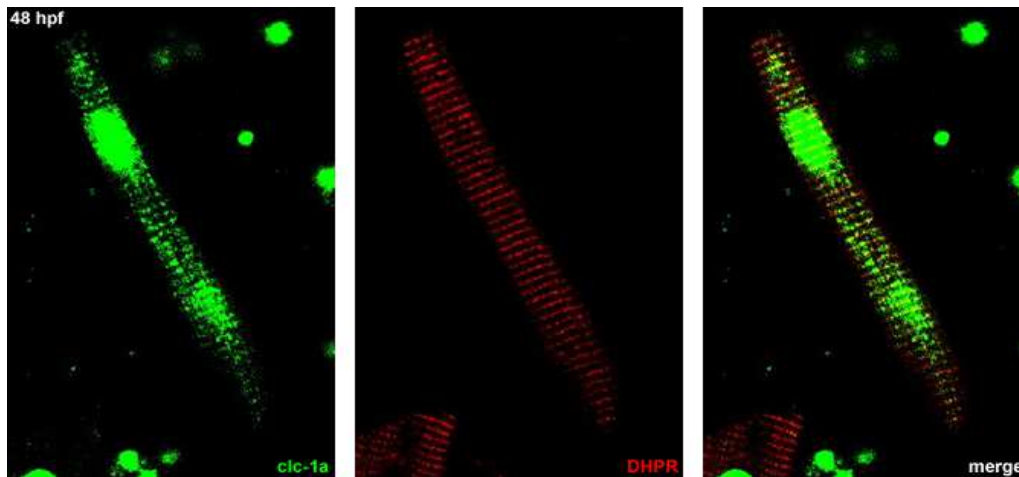
### 3.1.1 Localització de *clc-1a* en el múscul esquelètic

Un cop obtinguts els anticossos i validada la seva capacitat de detecció de la proteïna contra la que han estat generats, podem realitzar estudis d'immunofluorescència per tal d'esbrinar la localització subcel·lular de les proteïnes *clc-1*. Per això, primer es va realitzar una immunofluorescència en embrió sencer. En la figura 40A es mostra una immunofluorescència per *clc-1a* a 3 dpf i s'observa marcatge en totes les fibres musculars. En la figura 40B es mostra part del tronc a més augments.



**Figura 40.** Immunofluorescència de *clc-1a* en embrió sencer. En **A** es mostra tot l'embrió i s'aprecia senyal en les fibres musculars. *y* *sac vitel·lí*. En **B** es mostra la part del tronc emmarcada per un rectangle blanc a més augments.

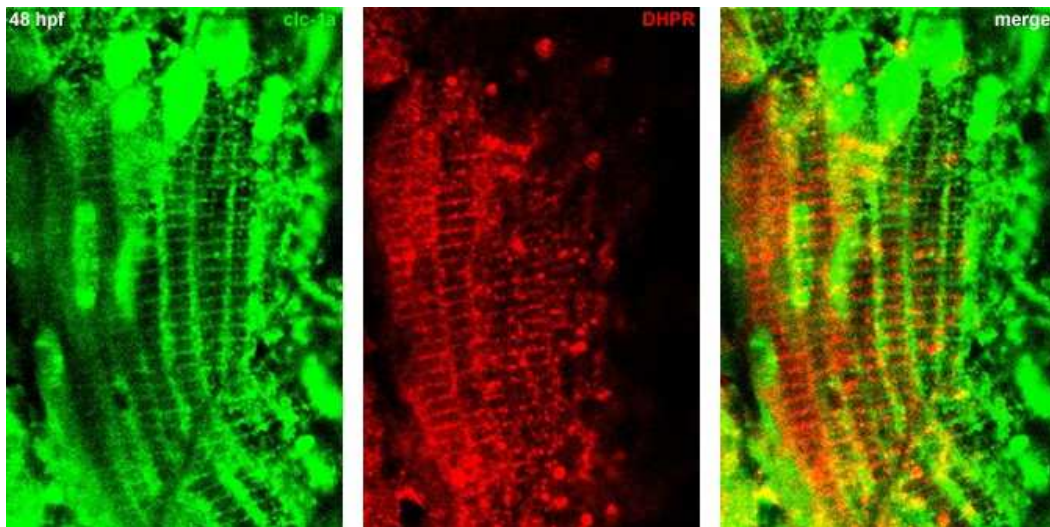
Per observar la localització subcel·lular amb més detall vam decidir posar a punt el cultiu de fibres musculars aïllades a partir d'embrions. Amb aquest procediment aconseguíem gran quantitat de fibres i poca brutícia de restes cel·lulars a partir de pocs embrions. Vam realitzar immunofluorescències dobles amb l'anticòs contra el canal de calci dels túbuls T, DHPR, per tenir una referència. En un principi esperaríem veure marcatge com a mínim al sarcolema, ja que CIC-1 es localitza en la membrana plasmàtica de les fibres musculars en mamífers. No obstant, al realitzar el marcatge en les fibres aïllades observem un marcatge amb un patró bandejat, no tan ben definit com el DHPR, i que no colocalitza amb DHPR ni marca el sarcolema (Figura 41).



**Figura 41.** Immunofluorescència de clc-1a i DHPR en fibres musculars aïllades a partir d'embrions de 48 hpf. A l'esquerre, s'observa el marcatge per clc-1a, el qual presenta un patró bandejat no tan definit com l'obtingut per DHPR (panell del centre) i no colocalitza amb aquest (dreta).

Posteriorment, vam trobar un treball en el que demostraven que la localització de CIC-1 depèn de l'activitat elèctrica del múscul. De manera que si s'aïllen les fibres musculars del seu entorn fisiològic, el canal s'internalitza. Efectivament, en l'article de Papponen et al, 2005 mostren unes immunofluorescències de CIC-1 en fibres aïllades de rata/ratolí amb un patró difós i intracel·lular molt similar al nostre. En canvi, al realitzar la immunofluorescències en seccions de múscul, el marcatge és present al sarcolema. Per aquesta raó, en col·laboració amb la Dra. Ana Méndez i el seu equip, del Campus de Bellvitge de la Universitat de Barcelona, vam realitzar seccions d'embrions en criostat.

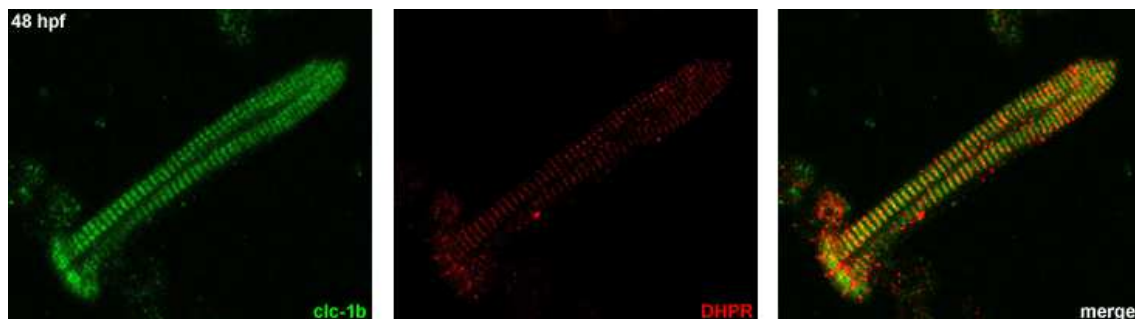
Efectivament, de la mateixa manera que en el treball de Papponen et al, 2005, el marcatge per clc-1a en seccions diferia del de les fibres (Figura 42). Tot i que el marcatge sembla que es doni al sarcolema, abans d'afirmar-ho seria necessari realitzar immunofluorescències amb marcadors de sarcolema (com podria ser la bomba  $N^+/K^+$  ATPasa) i realitzar els mateixos estudis en línies *knock out*, per tal de discriminar la senyal de les possibles inespecificitats (tenint en compte que l'anticòs per clc-1a presenta diverses inespecificitats per Western blot).



**Figura 42.** Immunofluorescència de *clc-1a* i DHPR en seccions d'embrions de 48 hpf. A l'esquerra s'observa el marcatge per *clc-1a*, el qual presenta un patró diferent al observat en fibres aïllades. En seccions, el marcatge suggereix que es localitza al sarcolema. El marcatge de DHPR s'observa de la mateixa manera que en les fibres (centre). El patró bandejat interior de *clc-1a* no coincideix amb el DHPR (dreta).

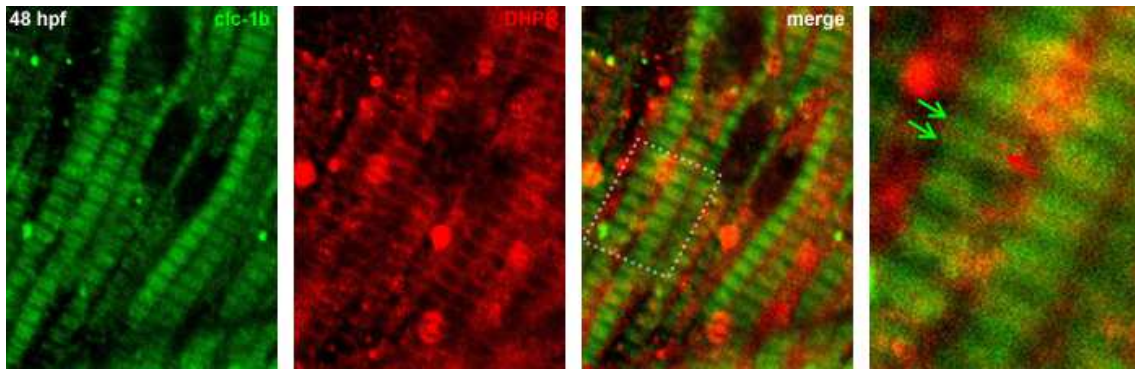
### 3.1.2 Localització de *clc-1b* en el múscul esquelètic

De la mateixa manera que per *clc-1a*, vam testar l'anticòs de *clc-1b* en el cultiu de fibres aïllades a partir d'embrions de 48 hpf. En la figura 43 es mostra un marcatge que també presenta un patró bandejat, però diferent de l'observat per *clc-1a*. La doble immunofluorescència amb el marcador DHPR mostra colocalització en alguns punts.



**Figura 43.** Immunofluorescència de *clc-1b* en fibres aïllades a partir d'embrions de 48hpf. Al panell de l'esquerra es mostra el marcatge per *clc-1b*, presentant un patró bandejat diferent al observat per *clc-1a*. Al mig, el marcatge de DHPR presenta el patró bandejat esperat. A la dreta, la superimposició de les dues imatges mostra alguns punts de colocalització.

Posteriorment, vam realitzar les immunofluorescències dobles amb DHPR en seccions. En la figura 44 s'observa com la localització de *clc-1b* *in vivo* difereix de la observada *in vitro*. Gràcies al marcatge amb DHPR s'aprecia com *clc-1b* es troba al voltant dels túbuls T.



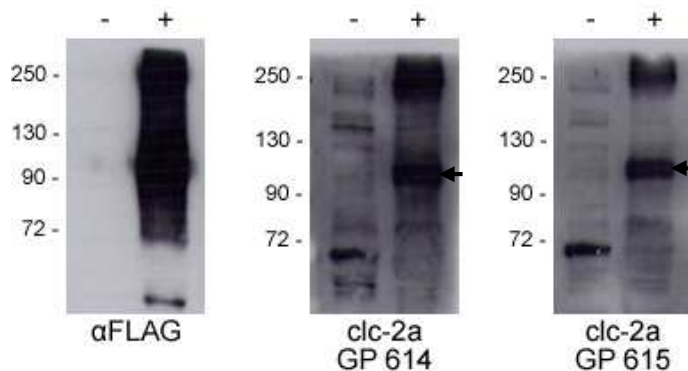
**Figura 44** Immunofluorescència de clc-1b i DHPR en seccions d'embrions de 48hpf. A l'esquerre s'observa el marcatge per clc-1b, el qual presenta un patró bandejat diferent al observat en fibres aïllades i del marcatge de clc-1a. Gràcies al marcatge amb DHPR (segon panell), s'aprecia com clc-1b es troba adjacent als túbuls T (tercer panell). A la dreta, es mostra el requadre blanc a més augments i les fletxes indiquen el marcatge de clc-1b (verdes) i de DHPR (vermelles).

No obstant, de la mateixa manera que per clc-1a, caldria realitzar estudis d'immunofluorescència amb marcadors específics d'altres compartiments subcel·lulars per tal d'esbrinar en quin d'ells es localitza exactament.

### 3.2 Anticossos contra les proteïnes clc-2a i clc-2b

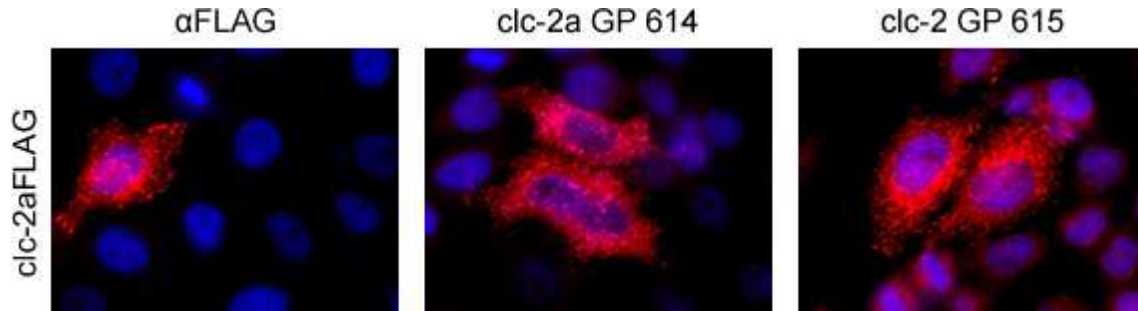
Es va procedir de la mateixa manera que pels anticossos de clc-1a i clc-1b. Primer es van provar els diferents sèrums dels dos animals per Western blot (Figura 45).

clc-2aFLAG



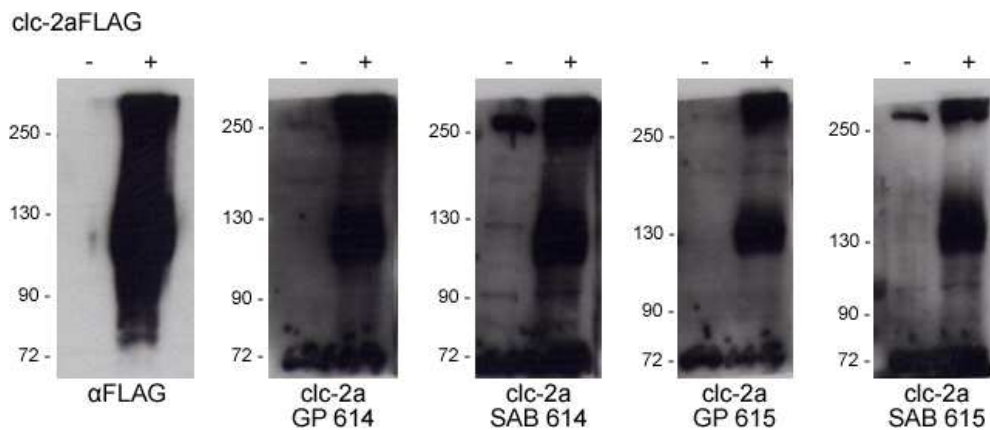
**Figura 45.** Prova dels sangrats de l'anticòs de clc-2a per western blot. Utilitzant  $\alpha$ FLAG com a control, s'observa com ambdós sèrums detecten la proteïna amb el pes corresponent, indicat per una fletxa.

També vam testar els sangrats per immunofluorescència i vam observar que ambdós sèrums detectaven la proteïna, mostrant una localització molt similar a la observada amb  $\alpha$ FLAG (Figura 46).



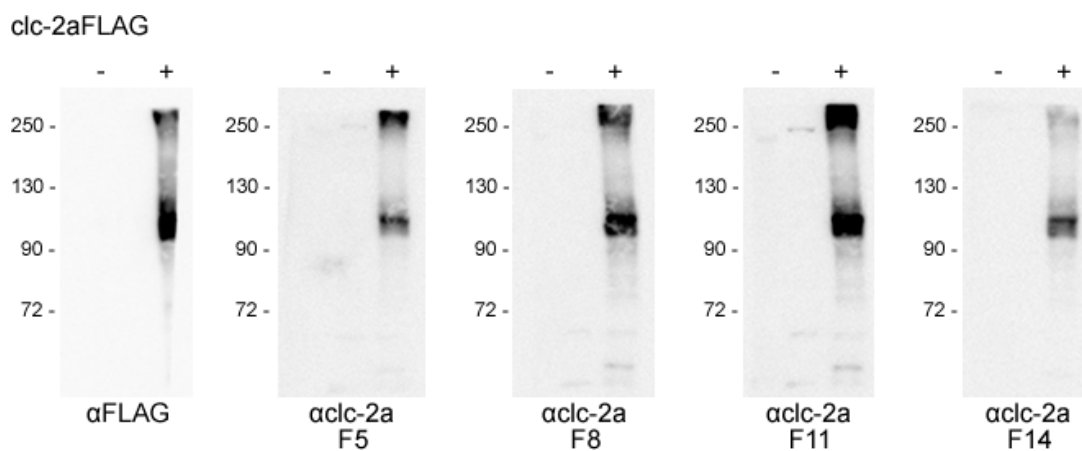
**Figura 46.** Prova dels sangrats de l'anticòs de clc-2a per immunofluorescència. Utilitzant  $\alpha$ FLAG com a control, s'observa com ambdós sèrums detecten la proteïna amb una localització similar.

Els dos sèrums de clc-2a detectaven una proteïna amb el pes esperat per clc-2a (107 kDa), així que es va continuar amb la immunització i vam obtenir els sangrats finals (SAB), que també van ser testats per Western blot (Figura 47).



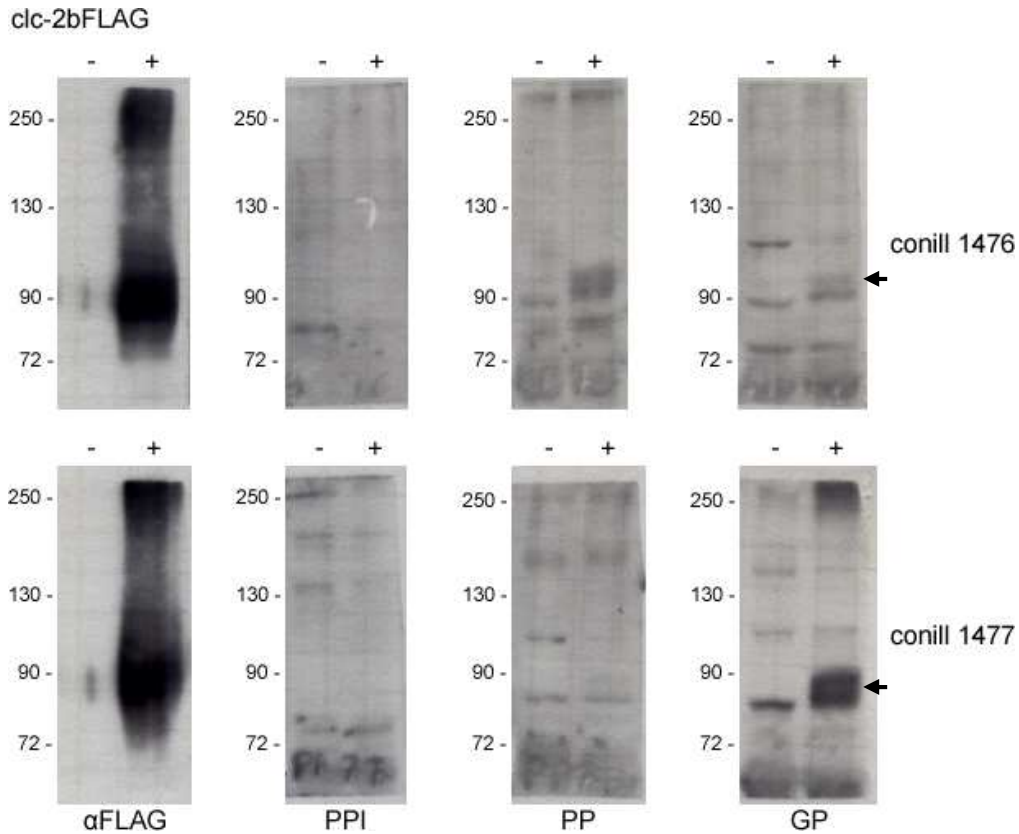
**Figura 47.** Prova dels sangrats finals de l'anticòs de clc-2a. Utilitzant  $\alpha$ FLAG com a control, s'observa com en el sangrat final (SAB) també apareix la banda amb el pes corresponent a clc-2a.

Seguidament es va purificar el sangrat final 614 amb la columna corresponent i es van testar les fraccions per Western blot (Figura 48).



**Figura 48.** Fraccions de l'anticòs generat contra clc-2a. "-" indica cèl·lules sense transfectar. "+" indica cèl·lules transfectades amb clc-2a. S'observa senyal només en els carrils pertinents a les cèl·lules transfectades amb clc-2aFLAG.

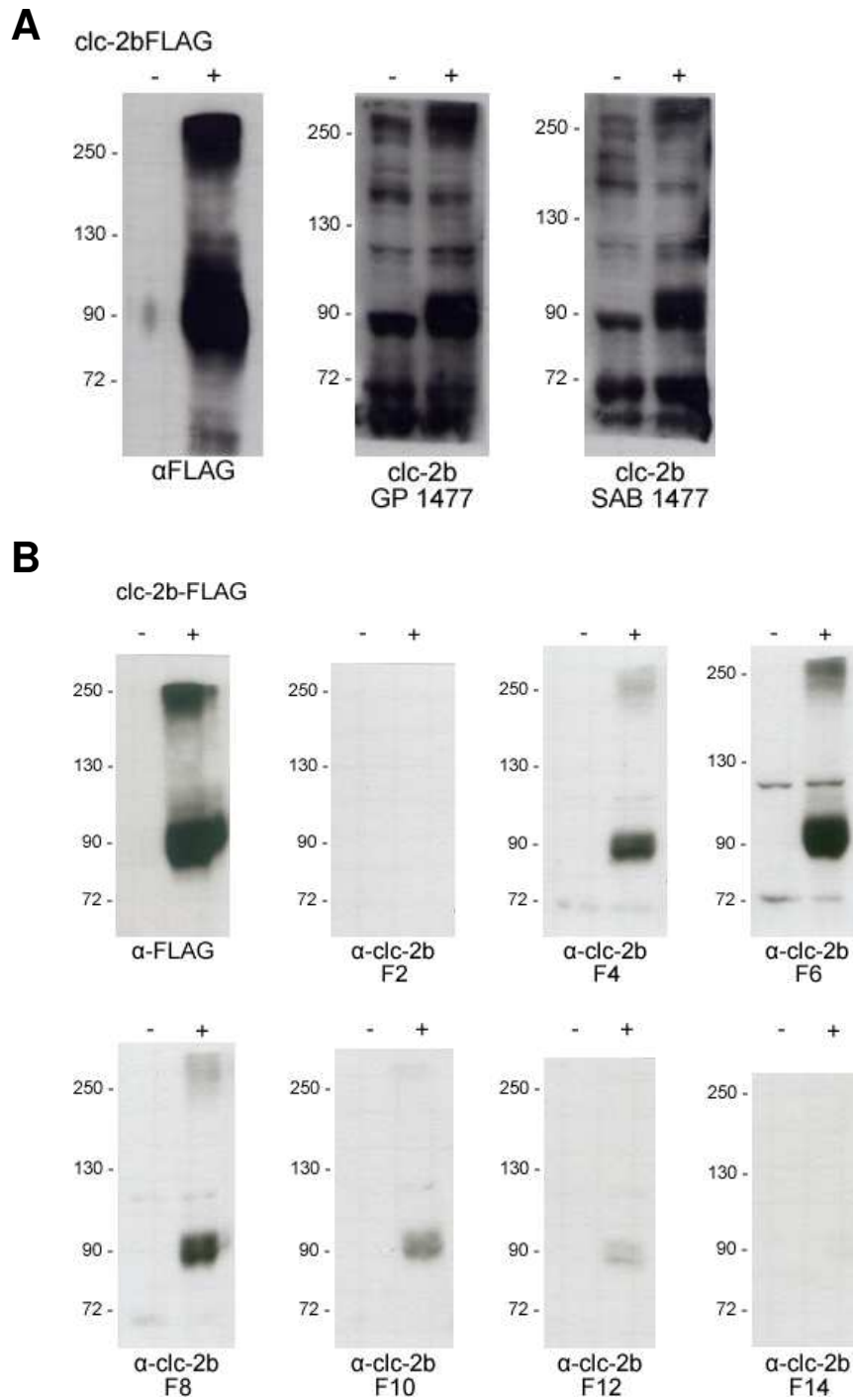
En el cas de *clc-2b*, el procediment va ser el mateix. No obstant, en la figura 49 s'observa com en el primer sangrat del conill 1476 apareix una senyal dèbil amb el pes corresponent a *clc-2b* (100 kDa) i com aquesta desapareix en el següent sangrat. En el sangrat GP la senyal hauria de ser igual o major, com és el cas del conill 1477. Així doncs es va procedir a immunitzar només l'animal 1477 fins a obtenir el sangrat final.



**Figura 49.** Prova dels primers sèrums dels anticossos contra *clc-2b*. En la part superior es mostren els sangrats de l'animal 1476, on s'observa com la senyal de 100 kDa es torna més tènue a partir del PP. En la part inferior es mostren els sangrats de l'animal 1477, on s'observa que la senyal es més forta després del PP. Les fletxes indiquen la banda corresponent a la proteïna *clc-2b*.

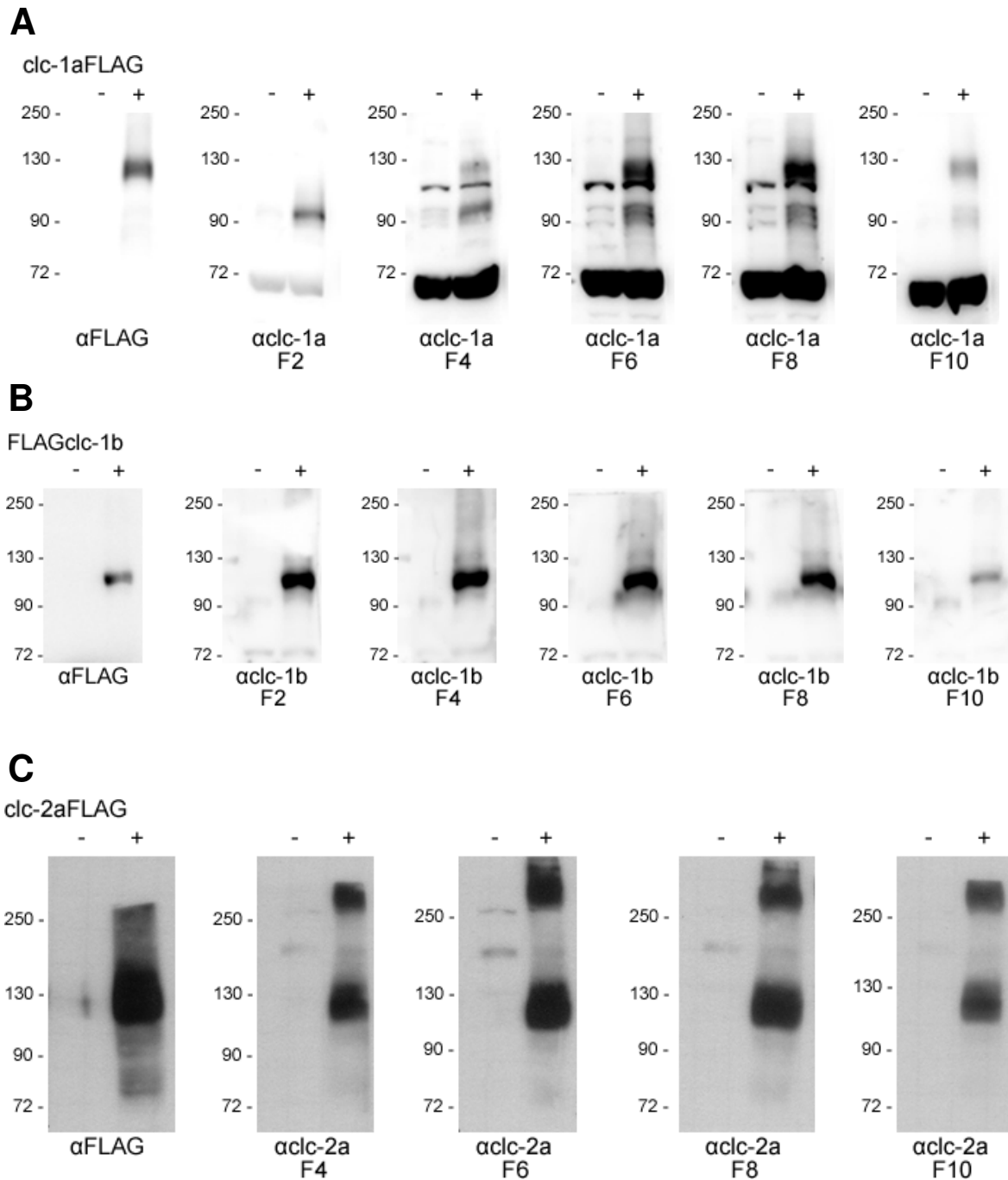
Posteriorment, vam provar el sangrat final de l'animal 1477 (Figura 50A) i finalment el vam purificar per testar les fraccions (Figura 50B).

Fins a aquest moment sempre havíem fet *pools* d'anticòs ajuntant diferents fraccions. D'aquesta manera obtenim un volum d'anticòs relativament gran, però a canvi de diluir-lo. Per això, a partir d'aquest punt vam decidir separar la meitat de la fracció més potent i guardar-la com a anticòs bo i, paral·lelament, ajuntar l'altre meitat de volum amb les altres fraccions bones i obtenir un *pool*. L'objectiu d'aquest mètode és la d'utilitzar el *pool* en els experiments de sobreexpressió en cultius a més de tenir un bon anticòs per utilitzar en el teixit dels animals, on la proteïna és menys abundant (en comparació amb els cultius cel·lulars). Com es pot observar en la figura 50B, es va considerar la fracció F6 com la més potent de *clc-2b*.



**Figura 50. A** Prova dels sangrats finals de l'anticòs de clc-2b. Utilitzant  $\alpha$ FLAG com a control, s'observa com en el sangrat final (SAB) també apareix la banda amb el pes corresponent a clc-2b. **B** Fraccions de l'anticòs generat contra clc-2a. "-" indica cèl·lules sense transfectar. "+" indica cèl·lules transfectades amb clc-2a.

Per tal de millorar la senyal dels anticossos generats fins ara, es va decidir tornar-los a purificar i seguir el mateix procediment. En la figura 51 es mostra la segona purificació per clc-1a (A), clc-1b (B) i clc-2a (C).



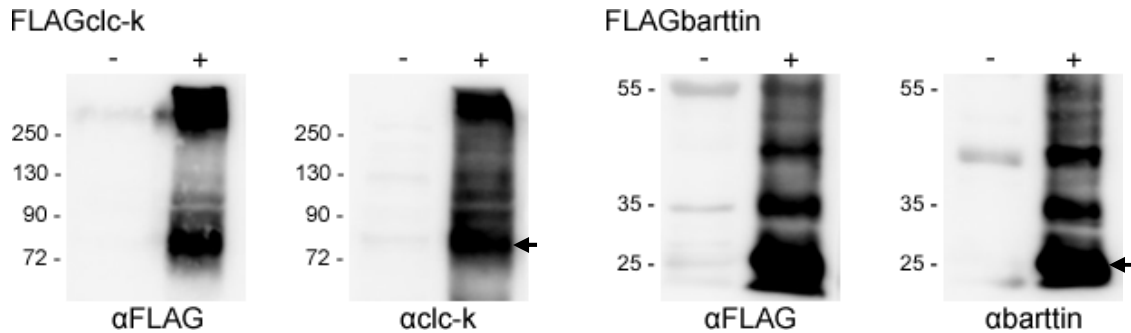
**Figura 51.** Segona purificació dels anticossos contra clc-1a (A), clc-1b (B) i clc-2a (C). “-” indica cèl·lules sense transfectar. “+” indica cèl·lules transfectades amb el canal corresponent i indicat a la part superior.

### 3.3 Anticossos contra les proteïnes clc-k i barttin

Per generar anticossos contra les proteïnes clc-k i barttin també es van immunitzar dos conills per cadascuna. En aquesta tesi només s’ha provat que els anticossos detectin les proteïnes per les quals han estat dissenyats (els sangrats van ser testats anteriorment per anteriors doctorants del grup). En la figura 52 s’observa que ambdós anticossos detecten una banda amb el pes corresponent per clc-k (76 kDa) i barttin (19



kDa), respectivament, que coincideix amb les bandes detectades amb el control positiu FLAG.



**Figura 52.** Prova dels anticossos contra *clc-k* i *barttin*. “-” indica cèl·lules sense transfectar. “+” indica cèl·lules transfectades amb la proteïna indicada a la part superior. Les fletxes indiquen la banda corresponent a les proteïnes *clc-k* (esquerre) i *barttin* (dreta), que presenten el mateix pes que el marcatge obtingut per l’anticòs FLAG.

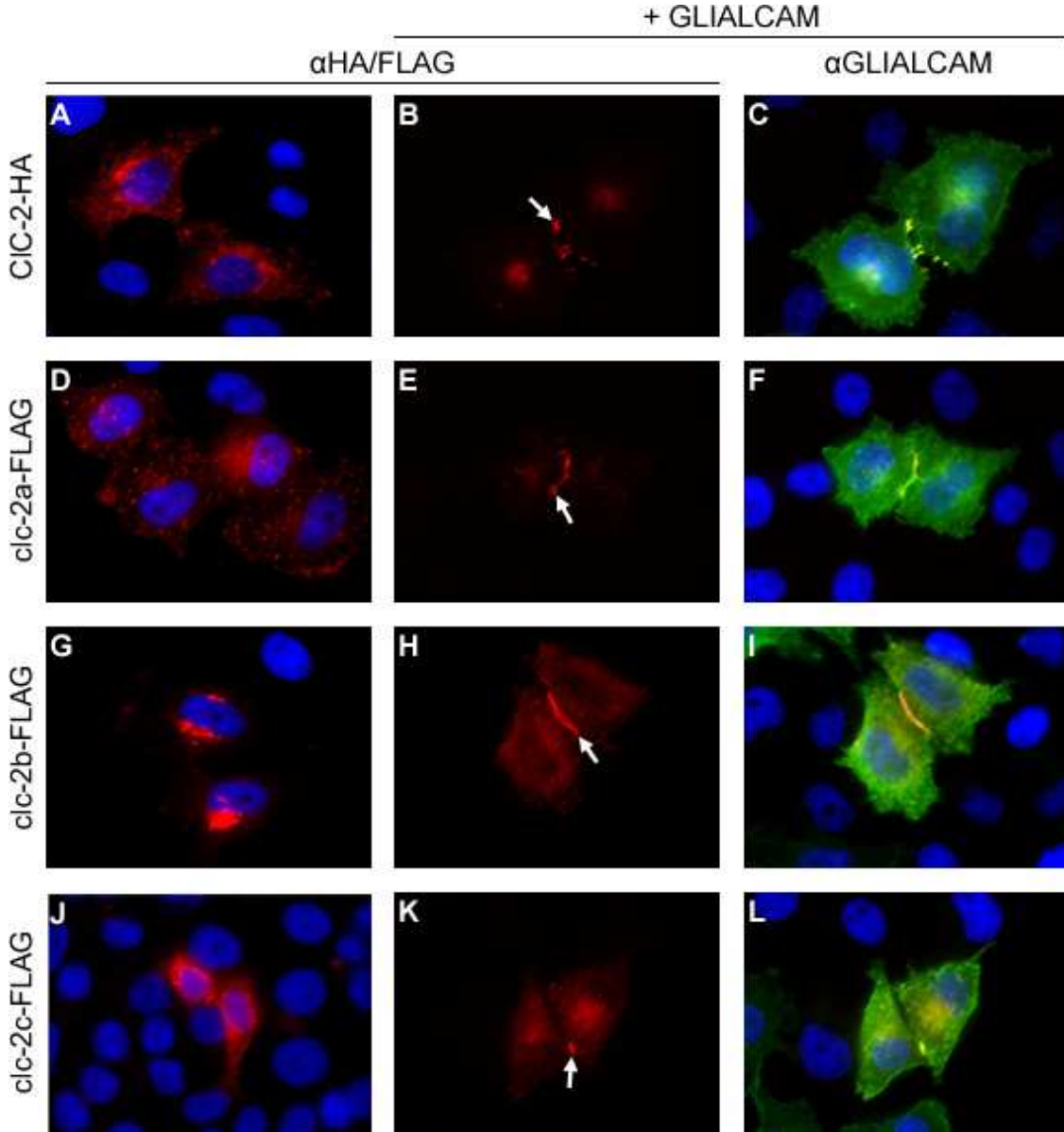
## 4. Interacció de les proteïnes *clc* amb les seves subunitats

Com s’explica en l’apartat d’introducció, se sap que algunes proteïnes CIC interaccionen amb altres proteïnes, servint-se d’aquestes subunitats per modificar el seu tràfic i les seves propietats biofísiques. Breument, *CIC-2* interacciona amb *GlialCAM* en les cèl·lules gials per localitzar-se en les unions cel·lulars i és capaç d’activar-se també a potencials despolaritzants permetent un flux d’entrada de clorur. En canvi, les proteïnes *CIC-Ka* i *CIC-Kb* requereixen obligatòriament de la subunitat *Barttin* per localitzar-se en la membrana basolateral de les cèl·lules epitelials de l’oïda interna i del tub renal per esdevenir funcionals. La qüestió que ens vam plantejar en aquest punt era si aquestes interaccions es conservaven en el peix zebra. Per aquesta raó, es van clonar en vectors d’expressió per cèl·lules de mamífer els cDNA dels 3 *clcn2* amb un epítot FLAG al C-terminal per la seva detecció. Les proteïnes *clc-k* i *barttin* es van construir amb i sense FLAG en l’extrem N-terminal. A més, es van contruir *CIC-K1* de rata (*rCIC-K1*) i *Barttin* humana (*hBarttin*) amb FLAG al C-terminal.

### 4.1 Interacció de *clc-2* amb *GlialCAM*

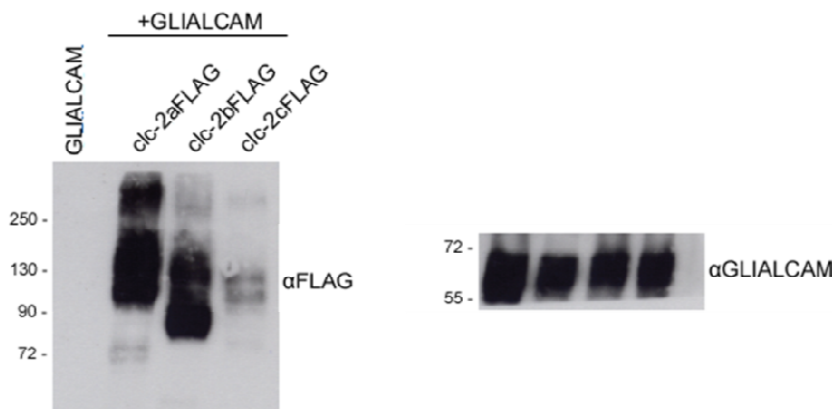
Vam coexpressar les tres proteïnes *clc-2* de peix zebra amb *GlialCAM* en la línia cel·lular HeLa i vam realitzar una immunofluorescència amb l’anticòs  $\alpha$ FLAG per detectar els *clc-2* i  $\alpha$ *GlialCAM* C2 (generat al laboratori). Es va observar la localització de les proteïnes *clc-2* en absència i presència de *GlialCAM* per tal d’examinar els possibles canvis de tràfic cel·lular.

De la mateixa manera que CIC-2, els tres canals clc-2 del peix zebra es troben principalment localitzats intracel·lularment (Figura 53A, D, G i J). Quan es troben en coexpressió amb GlialCAM, tant clc-2a com clc-2b es concentren en les unions cel·lulars (Figura 53E i H).



**Figura 53.** Localització de les proteïnes clc-2 de peix zebra en cèl·lules HeLa, soles o juntament amb GlialCAM. **A-C** La proteïna CIC-2 (en vermell) humana es localitza en les unions cel·lulars (fletxa blanca) quan es troba en coexpressió amb GlialCAM (en verd). El mateix comportament s'observa per clc-2a (**D-F**), clc-2b (**G-I**) i clc-2c (**J-L**), tot i que en aquest últim amb menor eficiència.

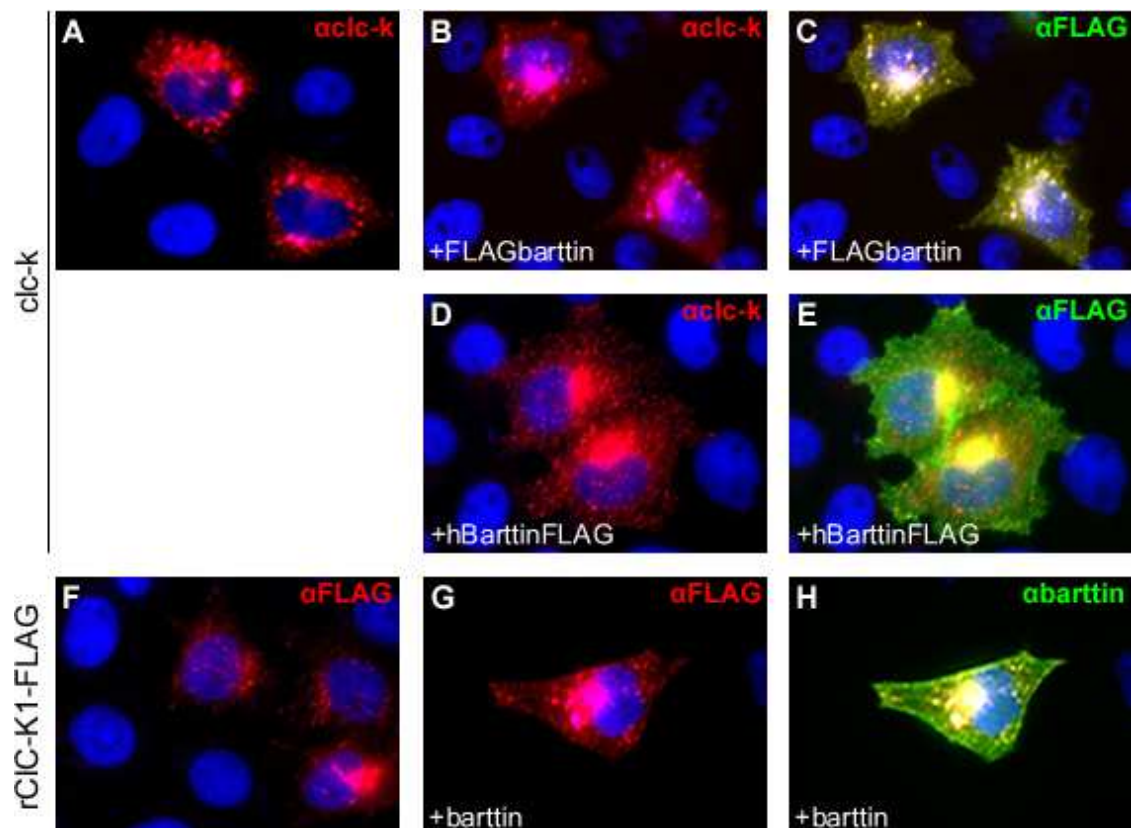
clc-2c també es localitza en les unions (Figura 53K), tot i que amb una menor eficiència probablement degut a inferiors nivells de proteïna, com s'observa per Western blot (Figura 54).



**Figura 54.** Nivells de proteïna dels clc-2 de peix zebra coexpressats amb GLIALCAM humà. Els residus de glicosilació estan conservats en el peix zebra, per això s'observen diverses bandes, corresponents a diferents variants glicosilades. Destacar els baixos nivells de clc-2c.

## 4.2 Interacció de clc-k amb barttin

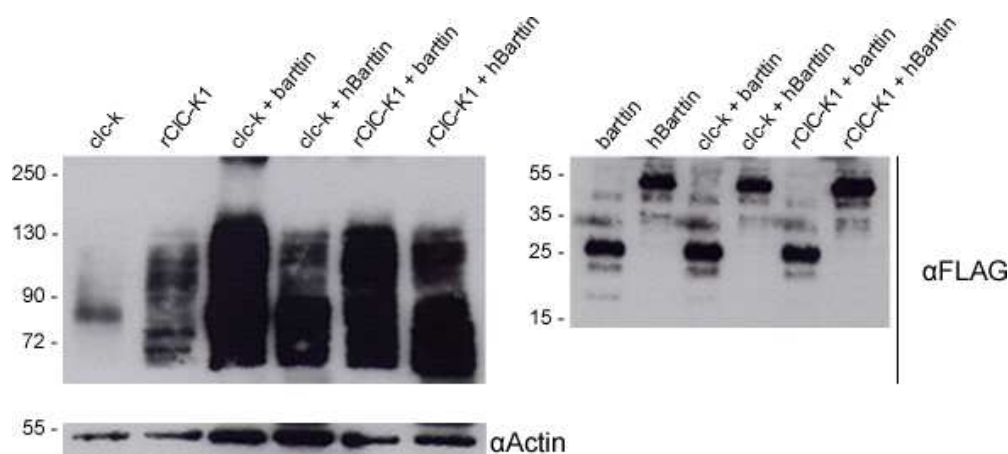
Vam procedir de la mateixa manera per les proteïnes clc-k. Per un costat, vam coexpressar clc-k amb barttin o hBarttin i, paral·lelament, vam coexpressar rCIC-K1 amb barttin. D'aquesta manera podríem adreçar la capacitat de barttin de localitzar tant clc-k com rCIC-K1 a la membrana.



**Figura 55.** Localització de les proteïnes clc-k i rCIC-K1 en cèl·lules HeLa, en absència o juntament amb barttin o hBarttin. La proteïna clc-k (en vermell) de peix zebra es localitza a la membrana quan es troba en coexpressió amb barttin (A-C) o hBarttin (D-E) (en verd). De la mateixa manera, rCIC-K1 també es localitza a la membrana quan es troba en coexpressió amb barttin (F-H). En blanc s'indica la proteïna cotransfectada.

L'expressió de clc-k i rClC-K1 sense barttin/hBarttin mostra una localització intracel·lular (Figura 55A i F). Efectivament, aquesta canvia per ambdós canals quan es coexpressen amb barttin (Figura 55B i G) o hBarttin (Figura 55D).

A més, per Western blot s'observa com tant barttin com hBarttin presenten la capacitat d'estabilitzar els nivells de proteïna de clc-k i rClC-K1, evitant-ne la seva degradació i presentant nivells més alts de proteïna (Figura 56).

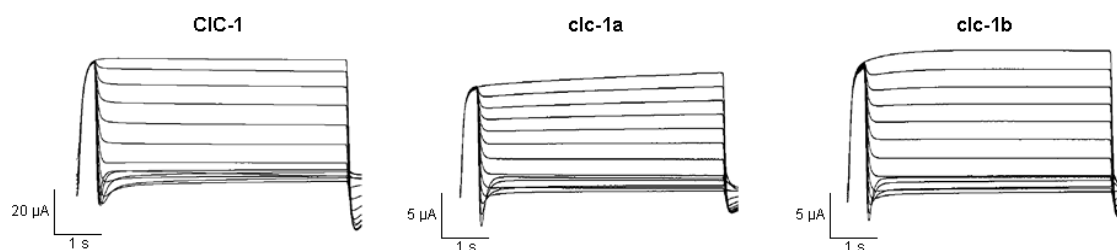


**Figura 56.** Estabilització de les proteïnes clc-k i rClC-K1 degut a la interacció amb barttin i hBarttin. Al panell de l'esquerre s'observa com els nivells d'ambdues proteïnes clc-k incrementen quan estan coexpressades amb les dues proteïnes barttin. A la dreta, els nivells de barttin o hBarttin no varien quan es troben soles o en presència de clc-k o rClC-K1. La diferència de les bandes entre barttin i hBarttin és degut a la diferència del pes de cadascuna, sent de aproximadament 25 kDa per barttin (+Flag) i d'aproximadament 40 kDa per hBarttin (+Flag).

## 5. Caracterització electrofisiològica

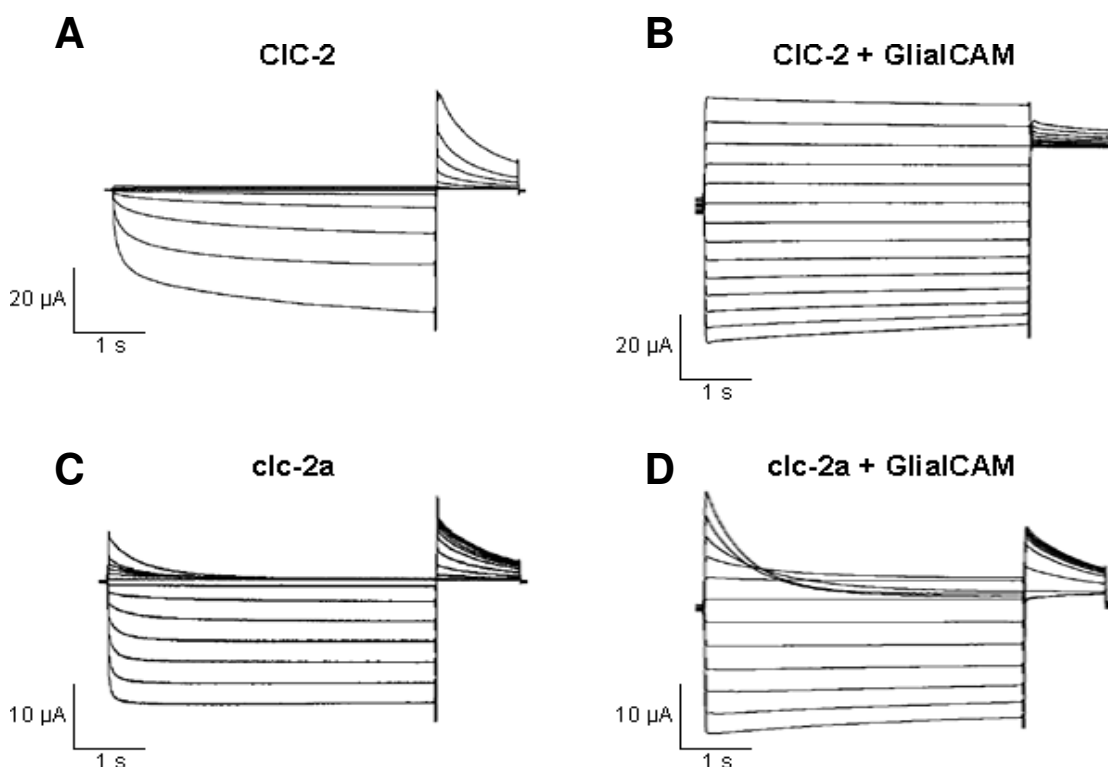
Com s'explica anteriorment, el fenomen de la subfuncionalització, a més d'un patró d'expressió en teixit diferencial, sovint es manifesta en la realització de funcions diferents la qual dependrà del teixit on s'expressi. En el cas dels canals iònics, aquest fet pot comportar diferències a nivell electrofisiològic. Per aquesta raó, gràcies al doctorand Héctor Gaitán, vam realitzar registres de cadascun dels clc de peix zebra en oòcits de *Xenopus* amb la tècnica *Two electrode voltage clamp*.

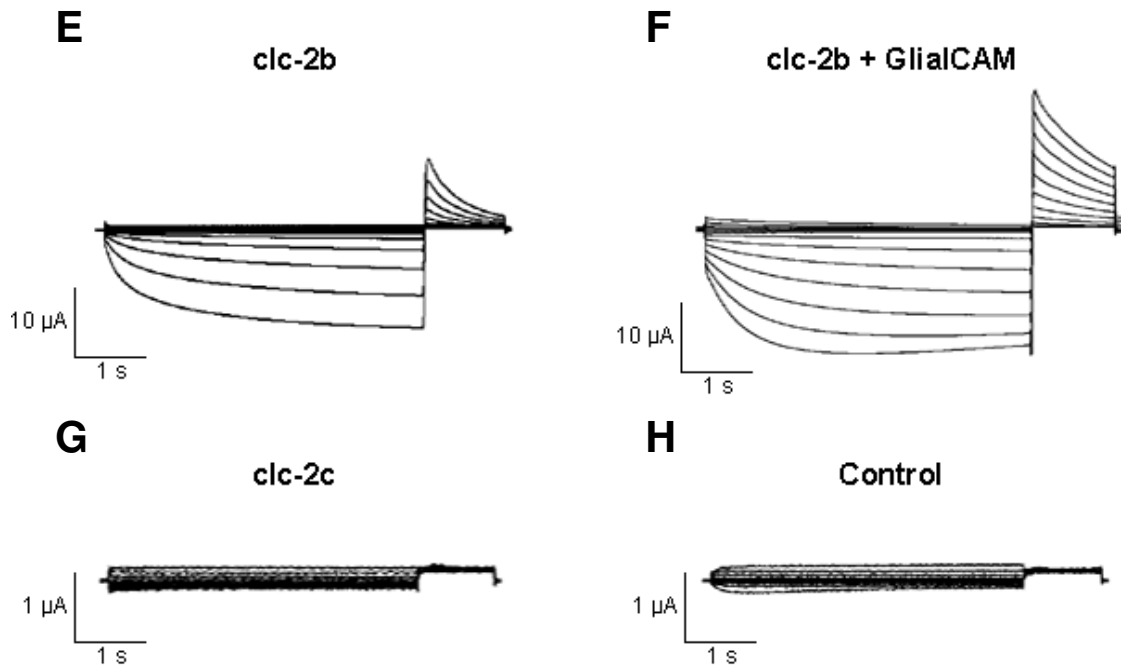
El canal ClC-1 és un canal que s'activa per potencials despolaritzats permetent un flux d'entrada de clorur en la cèl·lula (Figura 57). Amdós canals clc-1 de peix zebra també s'activen a potencials positius i presenten les ràpides inactivacions típiques de ClC-1 al aplicar un voltatge hiperpolaritzat. No obstant, presenten una amplitud molt menor respecte ClC-1.



**Figura 57.** Registres dels canals CIC-1 humà i clc-1a i clc-1b de peix zebra. El canal CIC-1 presenta unes grans corrents a potencials despolaritzants i s'inactiva ràpidament a potencials hiperpolaritzants. Els canals clc-1a i clc-1b comparteixen les característiques d'activació a potencials positius i d'inactivació a potencials negatius però presenten una menor amplitud.

Contràriament a CIC-1, el canal CIC-2 és activat a potencials hiperpolaritzants permetent un flux de sortida de clorur (Figura 58A). Els canals clc-2a i clc-2b també presenten aquestes corrents (Figura 58C i 58E), tot i que clc-2a mostra una cinètica d'activació més ràpida que CIC-2 o clc-2b. No obstant, no s'ha pogut registrar activitat del canal clc-2c, el qual presenta unes traces idèntiques a la d'òdits control (Figura 58G i 58H). Posteriorment vam estudiar els efectes de GlialCAM sobre l'activitat dels canals del peix zebra. La coexpressió de GlialCAM amb CIC-2 en modifica les corrents de manera que es dona un increment en l'amplitud d'aquestes, presenta una cinètica d'activació més ràpida i elimina la rectificació a potencials positius, convertint-se en un canal permanentment obert (Figura 58B). GlialCAM també incrementa lleugerament l'amplitud de les corrents generades per clc-2a i clc-2b (Figura 58D i 58F), tot i que en menor mesura que CIC-2. No obstant, només modifica la rectificació de clc-2a, mentre que per clc-2b es manté igual. La coexpressió de clc-2c amb GlialCAM tampoc ha generat corrents (dades no mostrades).





**Figura 58.** Registres dels canals CIC-2 humà i clc-2a, clc-2b i clc-2c de peix zebra. El canal CIC-2 mostra corrents de sortida a potencials hiperpolaritzants (A) mentre que la coexpressió amb GlialCAM elimina la rectificació a potencials positius (de manera que esdevé actiu en aquests voltatges), incrementa l'amplitud de les corrents i presenta una cinètica d'activació més ràpida (B). El canals clc-2a (C) i clc-2b (E) també presenten corrents activades per potencials hiperpolaritzants, tot i que la cinètica d'activació de clc-2a és més ràpida. La coexpressió amb GlialCAM incrementa lleugerament les corrents de clc-2a (D) i clc-2b (F), tot i que només modifica la rectificació de clc-2a. El canal clc-2c no ha presentat corrents ni sol (G) ni amb GlialCAM, mostrant corrents similars a les obtingudes amb els oòcits control.



## **Capítol 2.**

# **Generació de transgènics**



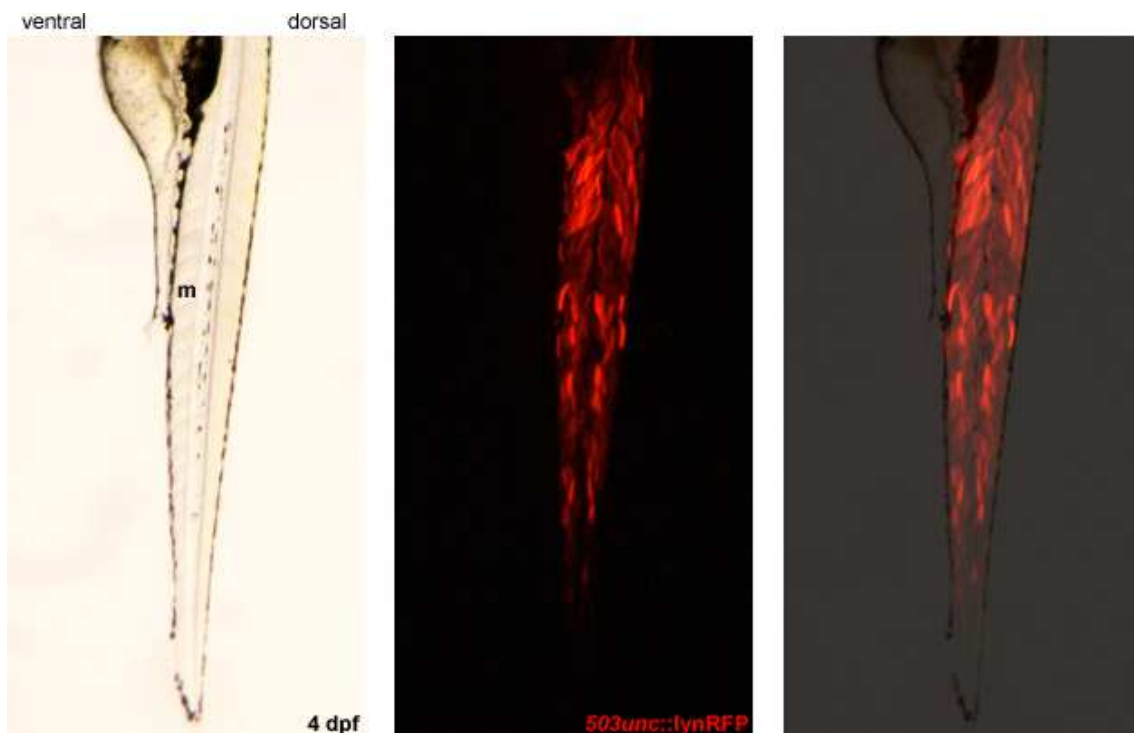


L'habilitat d'introduir gens exògens com les proteïnes fluorescents en el peix zebra, i especialment sota el control de promotors teixit específics, han fet d'aquest un excel·lent model per l'estudi de diversos teixits, ja sigui des del punt de vista de desenvolupament com d'una patologia. Aquesta metodologia també permet realitzar estudis de localització de proteïnes fusionades *in vivo*.

En aquest capítol s'explicarà els esforços realitzats per dur a terme experiments de transgènesi transitòria en peix zebra mitjançant l'eina de la transposasa Tol2.

## 1. Promotor teixit específic de múscul esquelètic: *503unc*

Seria interessant realitzar experiments de rescat en els animals *knock out* per *cln1*, en cas que presentin fenotip. Per fer-ho, vam pensar que ens seria molt útil l'eina de la Tol2, especialment utilitzant un promotor específic de múscul esquelètic. Per aquesta raó vam decidir clonar el promotor *503unc* de la xaperona *unc45b*, el qual a més de ser molt petit (només 500 parells de bases), presenta una forta expressió temprana a les 12 hpf en les cèl·lules adaxials i als somites que s'estan formant (Berger i Currie, 2013). Efectivament, la injecció de RFP sota el control d'aquest promotor dirigeix l'expressió de RFP només a les fibres de múscul esquelètic. En la figura 59 es mostra una imatge representativa d'un embrió de 4 dpf, presentant una forta expressió.



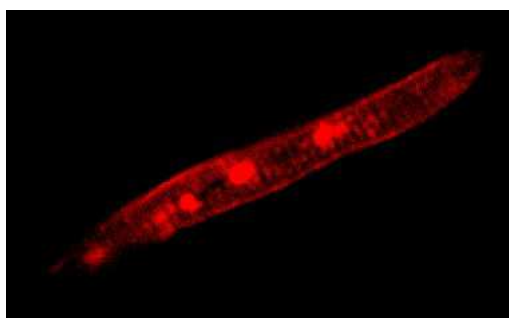
**Figura 59.** Expressió de lynRFP sota el control del promotor *503unc* a 4 dpf. S'observa expressió només en el múscul esquelètic. *m* múscul.

La clonació i la prova del promotor *503unc* va ser realitzada per l'estudiant de Biotecnologia Sara López durant el seu TFG.

### 1.1 Estudi de mutacions en el canal CIC-1 identificades en pacients amb Miotonia congènita

Una altra aplicació interessant d'aquesta eina és la d'estudiar el comportament d'una proteïna mutada respecte la WT, *in vivo*. Per exemple, en el cas d'una mutació identificada en un pacient, ens pot donar informació sobre com aquesta mutació afecta al tràfic cel·lular de la proteïna. D'aquesta manera, vam iniciar una col·laboració amb el Dr. Alfons Macaya de l'Hospital Vall d'Hebrón. Va diagnosticar un pacient amb Miotonia congènita amb la mutació A493E, la qual havia estat descrita prèviament com a recessiva (Ivanova et al, 2012; Skálová et al, 2013). No obstant, l'arbre genètic familiar proporcionat pel Dr. Macaya indicava un patró hereditari dominant. De fet, experiments d'electrofisiologia i bioquímics realitzats en oòcits de *Xenopus* pel doctorand Héctor Gaitán, un company del laboratori, apunten en la mateixa direcció. El mutant sol o en coexpressió amb el canal WT presenten unes corrents dràsticament reduïdes (dades no mostrades). Per aquesta raó vam decidir utilitzar el peix zebra i la transgènesi transitòria aprofitant el promotor *503unc* per expressar el canal CIC-1 humà WT i el mutant A493E i seguir-ne el comportament *in vivo*.

Sorprenentment, vam observar com l'alta eficiència obtinguda amb el constructe *503unc::RFP* queia dràsticament al injectar *503unc::CIC-1 WT RFP*. Només vam ser capaços de detectar fluorescència en 5 embrions de 34 que van sobreviure (d'un total de 386 embrions injectats). D'aquests, només s'ha observat expressió d'entre 1 i 2 fibres per embrió pel canal WT. El canal CIC-1 WT RFP es localitza al sarcolema i també presenta un patró bandejat a l'interior de la cèl·lula muscular, que molt probablement es tracta dels túbuls T (Figura 60).



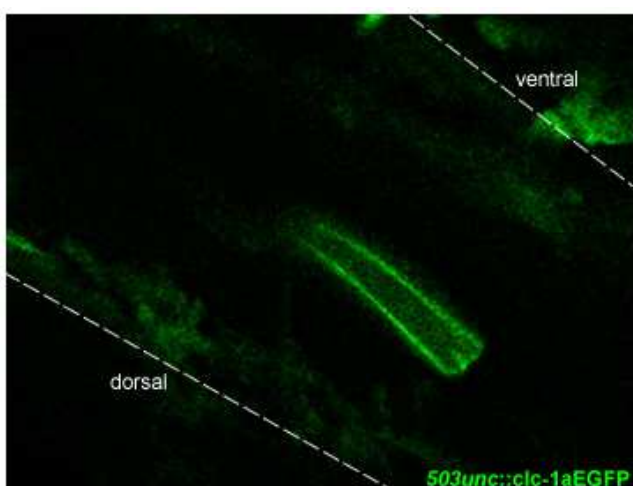
**Figura 60.** Expressió de CIC-1 WT RFP sota el control del promotor *503unc* a 4 dpf. S'observa marcatge al sarcolema i un patró bandejat a l'interior de la fibra muscular, probablement, els túbuls T.

Mai es va observar fluorescència pel mutant A493E (del qual van sobreviure 50/258 embrions injectats). Aquest fet és probablement degut a que, segons s'ha observat en sistemes heteròlegs de sobreexpressió, el mutant presenta uns nivells de proteïna significativament reduïts (dades no mostrades).

## 1.2 Estudi de la localització de les proteïnes *clc-1a* i *clc-1b* fusionades a proteïnes fluorescentes

Altres experiments interessant que es poden realitzar amb aquesta tècnica seria la d'expressar els canals *clc-1* de peix zebra fusionats amb una proteïna fluorescent i estudiar-ne la localització, validant també el marcatge observat amb anticossos (dels quals *clc-1a* presenta moltes inespecificitats almenys per Western blot). A més, fusionant els dos canals a proteïnes fluorescentes amb diferents espectres d'emissió es podria estudiar la localització de les dues proteïnes en una mateixa fibra muscular, estudi que ara mateix és impossible realitzar per immunofluorescència ja que els dos anticossos dels quals disposem estan generats en la mateixa espècie.

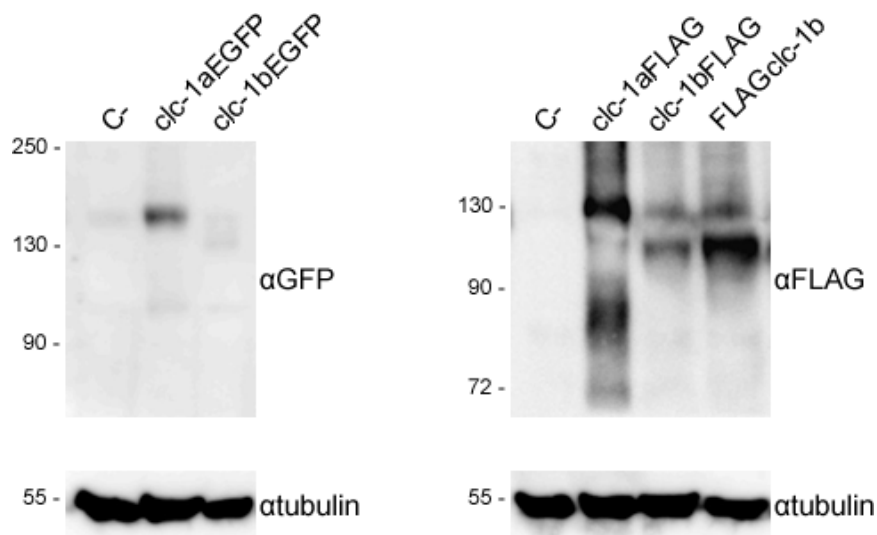
Per aquesta raó, es van construir els vectors necessaris per l'expressió dels canals *clc-1a* i *clc-1b* fusionats a EGFP i sota el control del promotor *503unc*. De la mateixa manera que havia passat al expressar el canal *CIC-1* WT RFP, la toxicitat letal era molt elevada i l'eficiència de transgènesi era baixíssima, trobant només marcatge del sarcolema en una sola fibra per *503unc::clc-1aEGFP* a 4 dpf (sobreviuen 33/408 embrions injectats) (Figura 61). Mai s'ha observat fluorescència per *503unc::clc-1bEGFP* (sobreviuen 6/524 embrions injectats).



**Figura 61.** Expressió de *clc-1aEGFP* sota el control del promotor *503unc* a 4 dpf. S'observa marcatge només al sarcolema.

La rodopsina és un receptor acoblat a proteïna G present en els bastons de la retina i responsables d'una cascada de senyalització dependent de llum (Palczewski, 2006). De la mateixa manera que els *CIC*, el seu extrem C-terminal interacciona amb diferents

components cel·lulars que regulen el seu correcte tràfic i la seva estabilitat (Sung et al, 1994; Deretic et al, 1998). S'ha observat que petites delecions d'aquesta regió provoquen una caiguda en els nivells de proteïna i que la fusió de GFP en diferents punts del C-terminal provoquen la deslocalització d'aquesta, probablement interferint en la interacció dels components que participen en el seu transport, mentre que la fusió entre uns residus específics sembla que no interfereixen en cap dels mecanismes de senyalització i trafica correctament fins al compartiment cel·lular que li correspon (Tam et al, 2000; Concepcion et al, 2002; Moritz et al, 2001). Pensant en la possibilitat que la fusió de EGFP pugui tenir un efecte similar sobre les proteïnes clc-1 del peix zebra, vam decidir generar les construccions fluorescentes per expressar-les en cèl·lules HEK293 i evaluar-ne els nivells de proteïna respecte a les fusions dels canals amb el tag FLAG, les quals sabem que sí s'expressen. En la figura 62 s'observa per Western blot com els nivells de les proteïnes clc-1 fusionades a EGFP es redueixen, sent els de clc-1b imperceptibles, mentre que sí s'expressa quan presenta el tag FLAG tant al N com C-terminal.



**Figura 62.** Reducció dels nivells de les proteïnes clc-1 fusionades amb EGFP. A l'esquerre s'observa com la fusió de la EGFP a l'extrem C-terminal provoca una caiguda tant dels nivells de proteïna de clc-1a com de clc-1b, sent els d'aquest últim imperceptibles. Les fusions amb FLAG sí que s'expressen totes.

Segons els resultats obtinguts en línies cel·lulars, l'addició d'un *tag* gran com una proteïna fluorescent a l'extrem C-terminal de les proteïnes clc-1 del peix zebra té un efecte negatiu sobre els nivells d'aquestes. Això pot ser degut a un mal plegament o incorrecte conformació de les proteïnes de fusió que poden impedir la interacció amb altres proteïnes o components cel·lulars.

**Capítol 3.**  
**Generació de models animals en**  
**peix zebra**



Per tal d'estudiar qualsevol procés fisiològic o mecanismes alterats en una malaltia, és necessari desenvolupar o disposar d'un bon model en el qual poder-hi treballar. En el present capítol s'explicaran les diferents aproximacions seguides per tal de generar models en peix zebra per l'estudi de la Miotonia congènita provocada per la falta de CIC-1, tant en models de *knock down* mitjançant l'ús de *morpholinos* com d'animals *knock out* mitjançant el sistema CRISPR/Cas9.

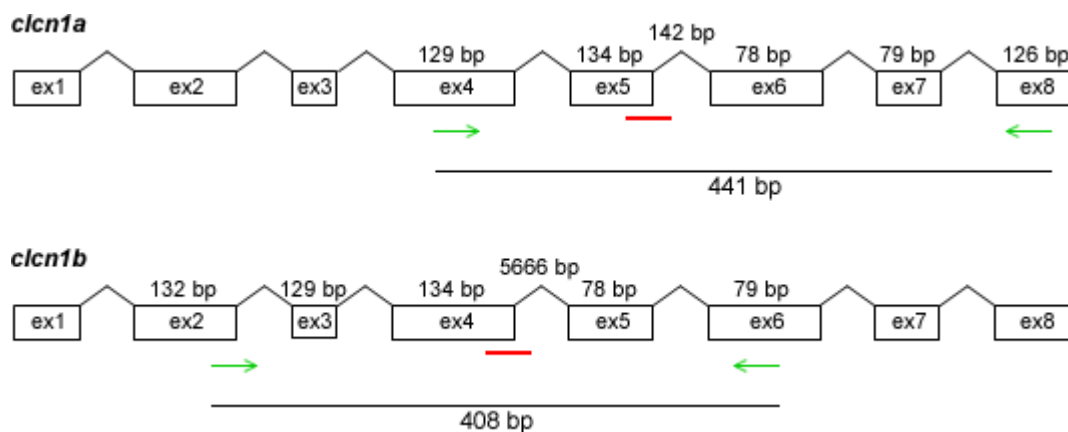
## 1. Model de *knock down* de *clcn1a* i *clcn1b*

Els *morpholino* són oligonucleòtids amb la capacitat d'hibridar-se a seqüències complementàries de mRNA i bloquejar-ne la traducció o alterar el procés d'*splicing* del pre-mRNA. En ambdós casos, s'aconsegueix reduir els nivells de proteïna. Els *morpholino* han estat molt útils en propulsar el peix zebra com a animal model especialment en el camp de la biologia del desenvolupament. El seu ús han permès identificar gens essencials en les diferents etapes embrionàries gràcies al seu fàcil ús i la transparència i ràpid desenvolupament dels embrions. Però també en el camp de models de malalties, on en diversos casos reproduïxen fenotips descrits en models generats en altres espècies, fent del peix zebra un model ràpid i fàcil d'utilitzar.

En aquesta tesi es va decidir utilitzar els *splicing morpholinos*, especialment perquè es pot quantificar la seva eficiència ràpida i fàcilment sense l'ús d'anticossos específics, simplement amb una RT-PCR i gels d'agarosa.

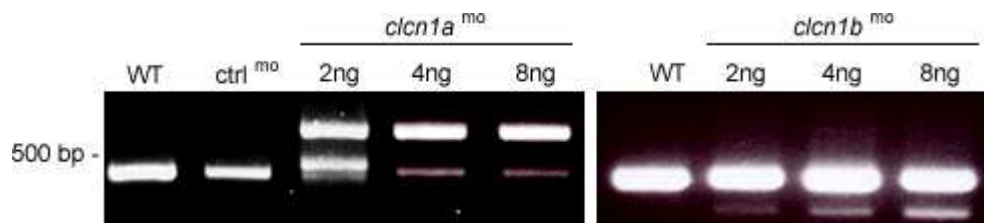
Es van dissenyar els *morpholinos* contra els llocs donadors d'*splicing* dels exons 5 i 4 dels gens *clcn1a* i *clcn1b*, respectivament. A més, es van dissenyar un parell de *primers* que permetrien l'amplificació dels exons 4-8 del cDNA de *clcn1a* donant lloc a un producte de PCR de 441 bp, i un altre parell de *primers* per amplificar els exons 2-6 del cDNA de *clcn1b*, donant lloc a un producte de PCR de 408 bp. En la figura 63 es mostra un esquema de l'estratègia a seguir, indicant la zona d'hibridació del *morpholino* i dels *primers* utilitzats.





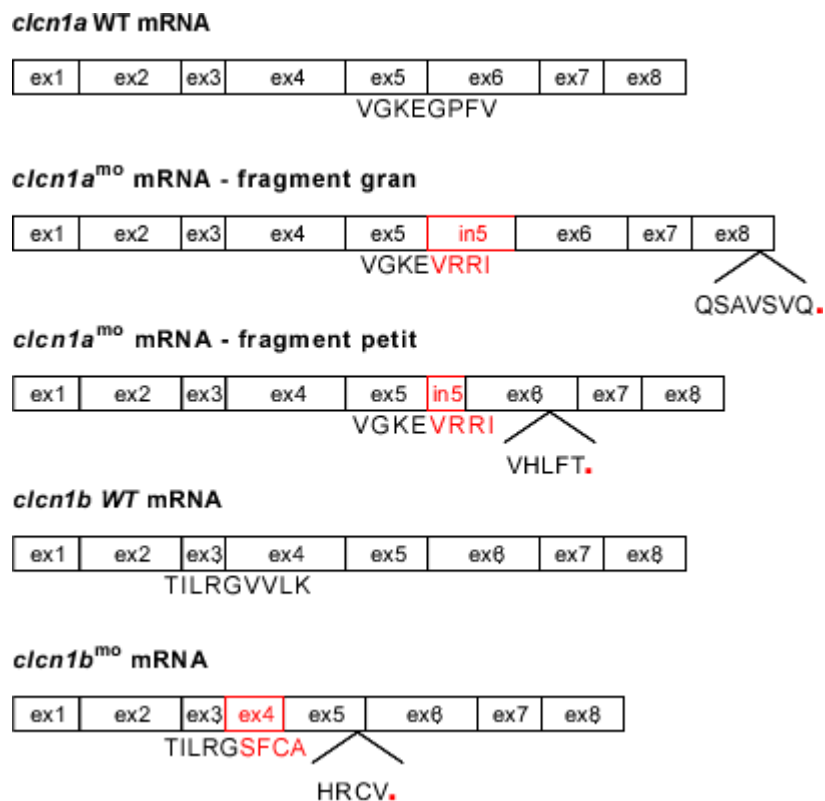
**Figura 63.** *Morpholino* d'*splicing* per la generació de models *knock down* per *clcn1a* i *clcn1b*. En vermell s'indica el lloc donador en el qual hibrida el *morpholino* pertinent. Les fletxes verdes indiquen els primers utilitzats per la RT-PCR per examinar els efectes del *morpholino*. La línia negra indica el fragment amplificat per les parelles de primers i la seva mida. S'indiquen la mida dels exons i de l'intró afectat pel *morpholino*.

Vam injectar diferents dosis per tal d'evaluar-ne l'efecte i la possible toxicitat, 2ng de *morpholino*/nL (56% de supervivència per *clcn1a*, n=280 embrions injectats; 62% per *clcn1b*, n=280), 4 ng/nl (42% per *clcn1a*, n=300; 38% per *clcn1b*, n=300) i 8ng/nL (21% per *clcn1a*, n=120; 18% per *clcn1b*, n=120). A més dels *morpholino* contra els nostres gens d'interès, també es recomana injectar un *morpholino* control no específic per cap gen. El *morpholino* s'injecta en l'estadi d'una cèl·lula i aquest, a mesura que l'embrió es divideix, es distribueix en les noves cèl·lules generades i exerceix el seu efecte. Per aquesta raó i degut a que no és un element replicable, l'efecte dels *morpholinos* es dilueix al cap de 3 dies post-injecció (dpi). Per aquest motiu i perquè hem demostrat prèviament que a l'estadi de 2 dpf ja hi ha expressió dels gens *clcn1a* i *clcn1b*, vam recollir els embrions a 2 dpi. Vam procedir a l'extracció de RNA total de *pools* d'entre 10 i 25 embrions per grup: WT o no injectats, *morpholino* control (*ctrl<sup>mo</sup>*), *morpholino clcn1a* (*clcn1a<sup>mo</sup>*) i *clcn1b* (*clcn1b<sup>mo</sup>*). Seguidament vam realitzar la RT-PCR d'un sol pas amb els parells de primers mencionats anteriorment. Al visualitzar els productes de PCR resultants (Figura 64) veiem que el *ctrl<sup>mo</sup>* no afecta ni als nivells ni al correcte *splicing*, com és d'esperar, mentre que el *clcn1a<sup>mo</sup>* genera dues formes aberrants d'*splicing* de mida superior a 2 ng, i a partir de 4 fins a 8 ng només s'observa la forma amb el tamany més gran. En les tres dosis mostrades s'observa presència de cDNA WT, tot i que la reducció dels nivells és molt evident. En el cas del *morpholino* de *clcn1b<sup>mo</sup>*, a partir de 2 ng s'observa una banda de mida inferior a la WT i augmenta en intensitat a mesura que s'incrementa la dosi fins a 4 ng i 8 ng. No obstant, a diferència del *clcn1a<sup>mo</sup>*, el fragment aberrant presenta uns nivells molt baixos mentre que el fragment WT continua presentant la mateixa intensitat.



**Figura 64.** Evaluació de l'alteració d'*splicing* provocada per la injecció de *morpholinos*. En els dos primers carrils s'observa el fragment WT tant en embrions no injectats (WT) com els injectats amb el *morpholino* control (*ctrl<sup>mo</sup>*). Els següents tres carrils corresponen als embrions injectats amb diferents dosis del *morpholino* de *clcn1a* (*clcn1a<sup>mo</sup>*), on s'observa l'aparició de dos fragments aberrants d'*splicing* més grans a 2 ng i només el més gran a 4 i 8 ng. A la dreta s'observa com 2 ng de *morpholino* de *clcn1b* (*clcn1b<sup>mo</sup>*) provoquen l'aparició d'un fragment de mida inferior. La intensitat d'aquesta banda incrementa a concentracions creixents de *morpholino*, tot i que els nivells són molt baixos.

Vam seqüenciar els fragments aberrants per esbrinar què s'havia incorporat (en el cas de *clcn1a*) o perdut (en el cas de *clcn1b*).



**Figura 65.** Efectes dels *splicing morpholinos*. En vermell s'indica la inserció de l'intró 5 en el mRNA de *clcn1a* (generant uns productes de 470bp i 583bp pels fragments petit i gran, respectivament) i la pèrdua parcial de l'exó 4 de *clcn1b* (generant un producte de 310bp). En ambdós casos es mostra el canvi de pauta de lectura i l'aparició del codó *stop* prematur indicat per un punt vermell.

Com es pot observar en la figura 65, el *clcn1a<sup>mo</sup>* ha resultat en la incorporació d'un fragment de l'intró 5 en el cas de la forma aberrant de mida més petita en la dosi de 2 ng (la qual presenta una mida de 470bp) i en la inserció de l'intró 5 sencer en les dosis de 4 i 8 ng (presentant una mida de 583bp). Ambdues formes provoquen un canvi en la pauta de lectura i l'aparició d'un codó *stop* prematur. En canvi, la injecció del *clcn1b<sup>mo</sup>* ha resultat en la pèrdua de part de l'exó 4 (donant lloc a un fragment de

310bp). De la mateixa manera, també s'observa un canvi en la pauta de lectura i l'aparició d'un codó *stop* prematur.

Seria interessant veure com afecta als nivells de proteïna, no obstant, tenim la dificultat que amb els nostres anticossos contra *clc-1a* i *clc-1b* no podem detectar aquestes proteïnes en estadi larvari.

A més, ens trobem davant altres inconvenients. Hem comprovat que la injecció dels *morpholino* és tòxica pels embrions, provocant alteracions en el desenvolupament d'aquests i en alguns casos, és letal. Altrament, també s'ha observat que els *morpholinos* presenten fenotips secundaris inespecífics, és a dir, que l'administració de *morpholinos* contra altre gens no relacionats entre ells, és probable veure fenotips del tipus edema pericàrdic o alteracions motores. Un altre desavantatge és la pèrdua de l'efecte al cap de tres dies després d'injectar. En el nostre cas, que no sabem en quin estadi pot aparèixer el possible fenotip miotònic, ens limita molt el curs d'acció. Finalment, tot i que els *morpholino* han funcionat i han demostrat ser útils en el passat, creiem que no són l'eina més adequada per continuar aquest treball. A banda de les raons esmentades, el fet que continuï havent mRNA WT, per poc que sigui, ja és suficient per emmascarar el fenotip. La pèrdua fins al 30% de l'activitat de *CLC-1* comença a ser patològica (Meyer-Kleine et al, 1995).

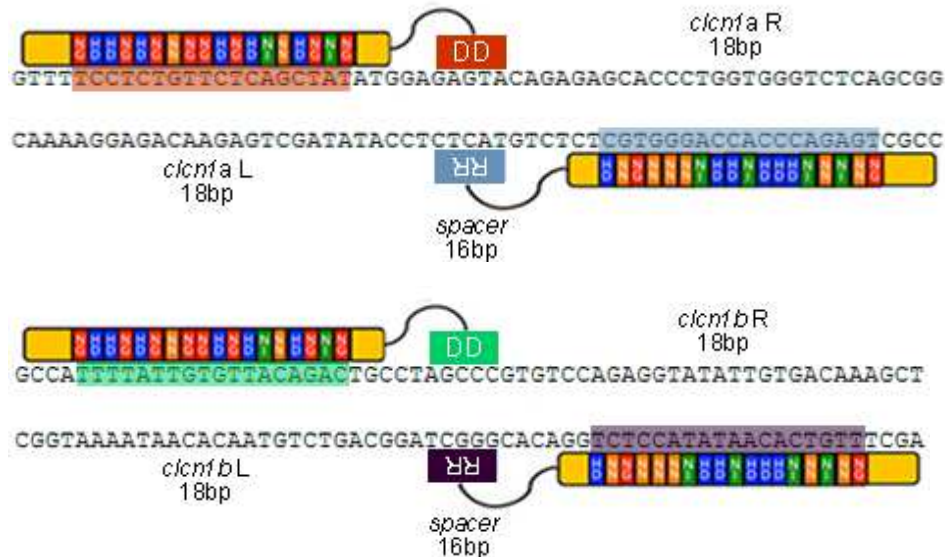
Per aquestes raons, vam decidir finalitzar els experiments de *knock down* i posar a punt les eines necessàries per la obtenció d'animals de pèrdua completa de funció mitjançant la generació d'animals *knock out*.

## 2. Models de pèrdua de funció

Per les qüestions mencionades en l'apartat anterior, a més de que els *morpholino* no sempre reproduïen tots els fenotips d'un animal mutant, vam decidir invertir esforços en la generació dels nostres propis mutants. Per això, ens ha estat molt útil la base de dades de TILLING (*Targeting Induced Local Lesions in Genomes*) del Sanger Institute d'on hem obtingut diversos al·lels. Paral·lelament, s'ha intentat generar mutants amb les tècniques d'edició genòmica TALEN i CRISPR/Cas.

## 2.1 Generació de línies *knock out* per *clcn1a* amb CRISPR/Cas

Prèviament a la generació de mutants de *clcn1*, ja havíem estat capaços de generar mutacions en un altre gen mitjançant les TALEN. A través d'una plataforma finançada pels NIH, ens van dissenyar i produir una parella de TALEN contra l'exó 2 de *clcn1a* i una altra contra *clcn1b*, tal i com es mostra en la Figura 66.

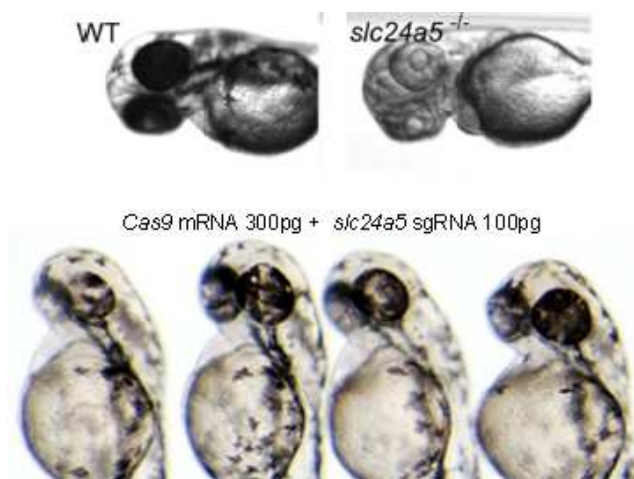


**Figura 66.** Disseny de les TALEN contra l'exó 2 de *clcn1a* i *clcn1b*. Els 18 nucleòtids ressaltats a banda i banda del spacer pertanyen als llocs d'unió de les TALEN.

Tot i que la tècnica havia funcionat anteriorment en un altre gen, la injecció dels RNAs de les dues parelles de TALEN no van funcionar. Tant la preparació dels mRNA de les TALEN, com la seva injecció en embrions i evaluació d'eficiència, va ser realitzat per l'estudiant de Biomedicina Cristina Gálvez durant el seu TFG.

En aquell moment ja havien començat a publicar-ne els primers articles d'edició genòmica en peix zebra amb el sistema CRISPR/Cas9, demostrant una alta eficiència mutagènica i alta transmissió de mutacions en la següent generació (Hwang et al, 2013). Per aquesta raó, vam decidir adoptar i posar apunt aquesta metodologia al nostre laboratori. Abans de començar a generar els sgRNA pels nostres gens d'interès, vam decidir provar la tècnica amb un sgRNA que ja s'hagués demostrat la seva eficiència i amb el qual no calia processar els embrions posteriorment per saber si s'havien generat mutacions. Vam escollir el gen de la tirosinasa (*slc24a5*), la pèrdua del qual provoca l'absència de la pigmentació en la pell i d'una manera més evident, en la retina. En l'article de Shah et al, 2015, demostren com embrions injectats amb aquest sgRNA juntament amb la endonucleasa Cas9 presenten un fenotip quimèric on es pot observar clarament la pèrdua de pigmentació, d'una manera molt similar a l'animal *knock out* ja existent. Vam injectar 100 pg del mateix *slc24a5* sgRNA que

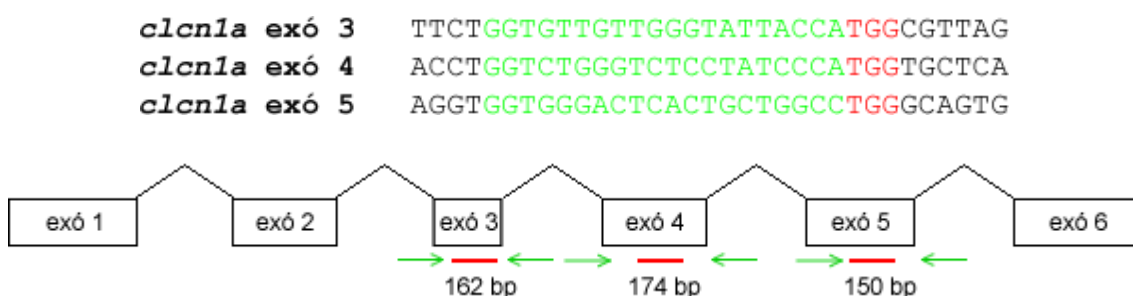
l'article juntament amb 300 pg de *Cas9* mRNA i al observar els embrions als 2 dpf observem com presenten pèrdua de pigmentació en la retina (Figura 67) (sobreviuen 95/137 injectats, dels quals 9 presenten un fenotip quimèric evident de pèrdua de pigmentació).



**Figura 67.** Optimització del sistema CRISPR/Cas9. A la part superior es mostren dos embrions de 2 dpf, un d'ells WT i un de la línia *knock out* per *slc24a5*, el qual no presenta pigmentació (imatges extretes de Shah et al, 2015). A sota, es mostren embrions de 2 dpf injectats amb 100pg de *slc24a5* sgRNA i 300 pg de *Cas9* mRNA. S'observa pèrdua de pigmentació de la retina en diferents graus.

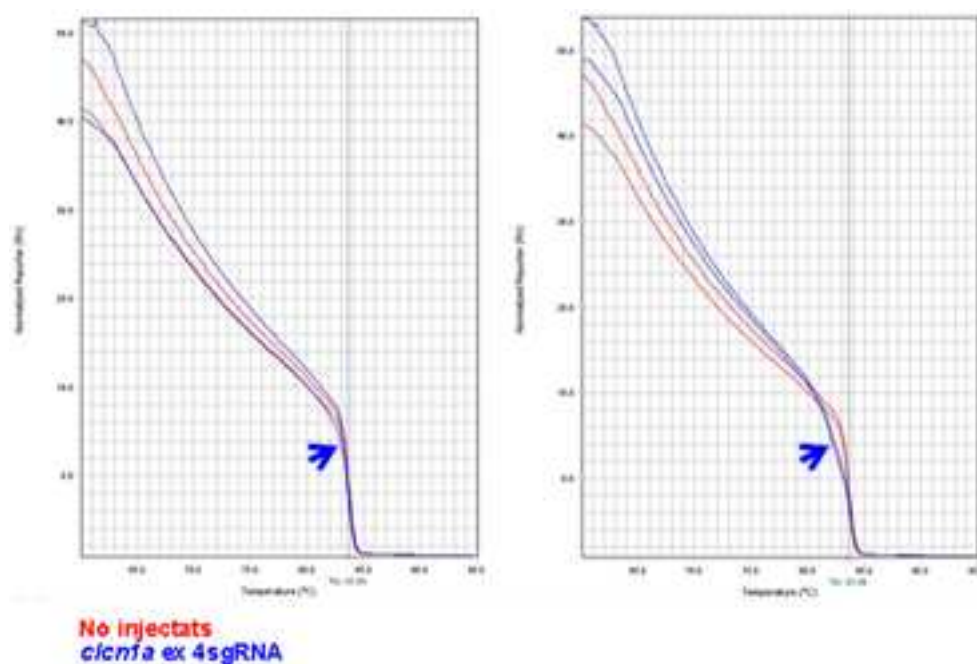
És important destacar en aquest punt que, mentre en diversos articles l'ús de la nucleasa *Cas9* de *Streptococcus pyogenes* (Addgene #42251) és molt eficient, no hem estat capaços d'induir mutacions fins que no hem provat la variant nls-zCas9-nls (Jao et al, 2013, Addgene #47929). Per tal d'aconseguir una eficiència mutagènica més alta en el peix zebra, en aquest treball han generat una *Cas9 codon-optimized* pel peix zebra a més d'incorporar-hi una senyalització de localització nuclear del virus SV40 als extrems amino i carboxil, millorant així el seu reclutament al nucli. Tots els mutants presentats en aquesta tesi s'han aconseguit utilitzant aquesta versió millorada.

Seguidament vam procedir al disseny de sgRNA per *clcn1a* amb les plataformes CRISPR Design (Zhang Lab, MIT) i CRISPRscan (Giráldez Lab, Moreno-Mateos et al, 2015). Vam decidir dissenyar-los pels exons 3, 4 i 5 de *clcn1a* i *clcn1b* (Figura 68).



**Figura 68.** Disseny de sgRNA per *clcn1a*. A dalt es mostra la seqüència dels sgRNA pels exons 3, 4 i 5 de *clcn1a*. En verd s'indica el sgRNA i en vermell la seqüència PAM. A sota, es mostra l'estructura genòmica de *clcn1a*. La línia vermella indica la regió del sgRNA i les fletxes verdes els primers dissenyats per amplificar aquesta regió per fer el criatge de mutants. A sota de cada parella de primers s'indica la mida del fragment amplificat.

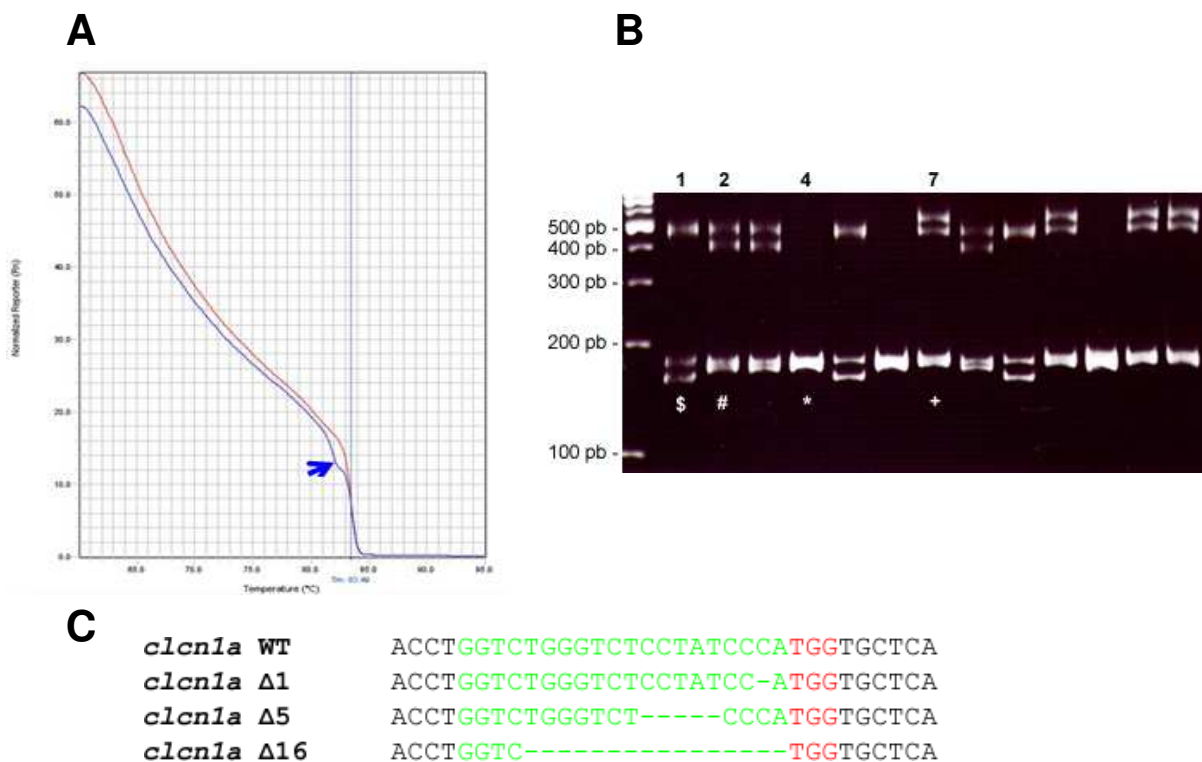
Vam injectar 100 pg de cada sgRNA juntament amb 300 pg de *Cas9* mRNA i vam fer un primer criatge a partir d'aquests embrions per tal d'evaluar l'eficiència mutagènica. Als 4 dpi es congelen i s'extreu el DNA genòmic d'embrions individuals i els assagem per PCR seguit d'un assaig de desnaturalització d'alta resolució (*High Resolution Melting*, HRM), on gràcies al perfil de les corbes de desnaturalització podrem discriminar aquells individus que hagin generat mutacions. En la figura 69 es presenten les corbes de desnaturalització on es mostren les obtingudes per embrions sense injectar com a controls i es solapen les corbes obtingudes dels embrions injectats. En la figura 69 (esquerre) s'observa com dos embrions (2/14 embrions injectats i assajats per HRM) presenten una corba de desnaturalització que es solapa perfectament amb la corba d'embrions els quals no han estat injectats i, per tant, deduïm que no han patit mutacions. En canvi, en la figura 69 (dreta) s'observa com les corbes presenten una pendent diferent a la dels embrions WT i, per tant, podem deduir que sí s'han generat mutacions (12/14 embrions injectats i assajats per HRM).



**Figura 69.** Mutacions en el gen *cln1a* amb CRISPR. En vermell es mostra la corba de *melting* d'embrions WT, no injectats, mentre que en blau es mostren les corbes d'embrions injectats amb *cln1a* ex4 sgRNA. A l'esquerre s'observa com un grup d'embrions presenten una corba que es solapa amb la d'embrions no injectats. A la dreta, s'observa com gran part dels embrions testats presenten corbes amb pendents diferents a la dels embrions no injectats. Les fletxes blaves indiquen el punt de la corba on la diferència entre WT i mutants és més evident.

La resta d'embrions es van deixar créixer fins a adults, moment en què es creua cada individu amb un animal WT. D'aquesta manera, assajant la descendència per HRM podem identificar els fundadors, aquells animals que presenten mutacions en la línia germinal i que són transmeses a la següent generació (Figura 70A). Es va seqüenciar un producte de PCR positiu per HRM de cada fundador i es va seleccionar un sol individu, el qual es va detectar que presentava una deleció de 16 nucleòtids en la regió

del sgRNA. La resta d'embrions de l'*outcross* es van deixar créixer fins a adults, moment en què es van genotipar. Vam decidir examinar els productes de PCR en un gel d'acrilamida al 12% i tenyir-lo posteriorment amb bromur d'etidi. Tot i que els àcids nucleics s'acostumen a visualitzar en gels d'agarosa, aquests no ens ofereixen prou resolució per discriminar diferències de pocs nucleòtids. Com s'observa en la figura 70B, es diferencien 4 al·lels diferents, sent un d'ells el WT (en el carril 4 indicat per un asterisc, presenta una sola banda). Els altres tres al·lels es van confirmar per seqüenciació, i així sabem que corresponen a una deleció de 16 nucleòtids (carril 1, indicat per \$), deleció de 5 nucleòtids (carril 2, indicat per #) i deleció de 1 nucleòtid (carril 7, indicat per +). En la figura 70C i D es mostra les mutacions a nivell de DNA genòmic i la seqüència de proteïnes resultant de cada al·lel, respectivament. En tots 3 al·lels, es dona un canvi en la pauta de lectura i l'aparició d'un codó *stop* prematur, de manera que molt probablement la proteïna resultant no serà funcional i, per tant, haguem obtingut animals *knock out*.



**D**

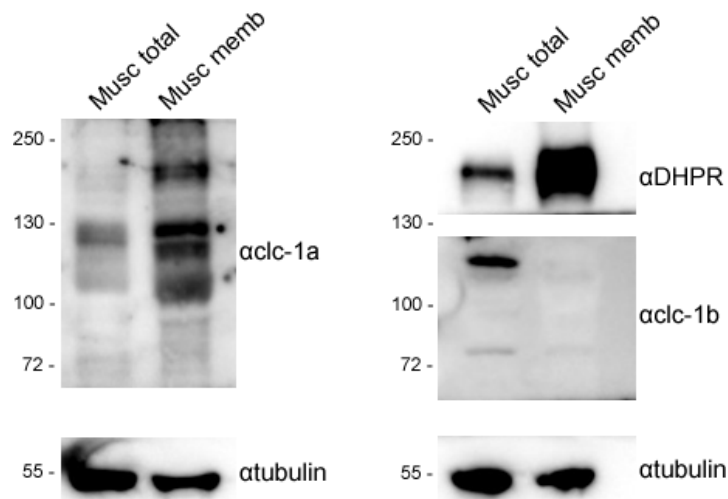
<i>clcn1a</i> WT	...IPLQYLVWVSYPMVLILFASLFCH...	1011 aa
<i>clcn1a</i> Δ1	...IPLQYLVWVSYPMVSSFLPPFSAT...	201 aa
<i>clcn1a</i> Δ5	...IPLQYLVWVSGAHPFCLPFLPPG...	329 aa
<i>clcn1a</i> Δ16	...IPLQYLVWVSSFLPPFSATWSLLR...	196 aa

**Figura 70.** Identificació d'al·lels de *clcn1a*. **A** Identificació de fundadors mitjançant HRM. En vermell es mostra la corba WT mentre que la blava pertany a un individu heterozigot. La fletxa blava mostra l'esglaó típic d'individus heterozigots. **B** Identificació dels diferents al·lels procedents d'un mateix fundador. En el gel d'acrilamida s'observen 4 tipus de mostres diferents: el carril 1 indicat per \$ correspon a la deleció de 16 nucleòtids, el carril 2 indicat per # correspon a la deleció de 5 nucleòtids, el carril 4 indicat per \* correspon al WT i el carril 7 indicat per + correspon a la deleció d'1 nucleòtid. **C** En la part superior es mostra la seqüència WT. A sota es mostren les mutacions pertinents a les delecions d'1, 5 i 16 nucleòtids (anomenades Δ1, Δ5 i Δ16, respectivament). En verd s'indica la seqüència corresponent al sgRNA i en vermell la seqüència PAM. **D** Seqüència d'aminoàcids resultant de les mutacions obtingudes. En vermell s'indica el primer residu en el qual es produeix un canvi en la pauta de lectura.

Vam decidir propagar només les delecions més grans, les línies Δ5 i Δ16. Els individus heterozigots de cada línia es van creuar entre ells i un cop la descendència era adulta es van genotipar. Tal i com s'espera, vam trobar homozigots adults, per tant són viables a més de fèrtils.

### 2.1.1 Validació de les línies mutants generades

En aquest moment ens vam plantejar la possibilitat d'obtenir extractes enriquits en proteïnes de membrana, fent la detecció de proteïnes poc abundants, com els CIC, més fàcil. Seguint el protocol de Muñoz et al, 1995 vam aconseguir obtenir aquests extractes a partir de múscul esquelètic de peixos WT i, comparant amb un extracte total, s'observa com proteïnes de membrana com el DHPR presenten més senyal (Figura 71). S'observa com també la senyal obtinguda per *clc-1a* és més evident. En canvi, la marca per *clc-1b* és molt tènue.

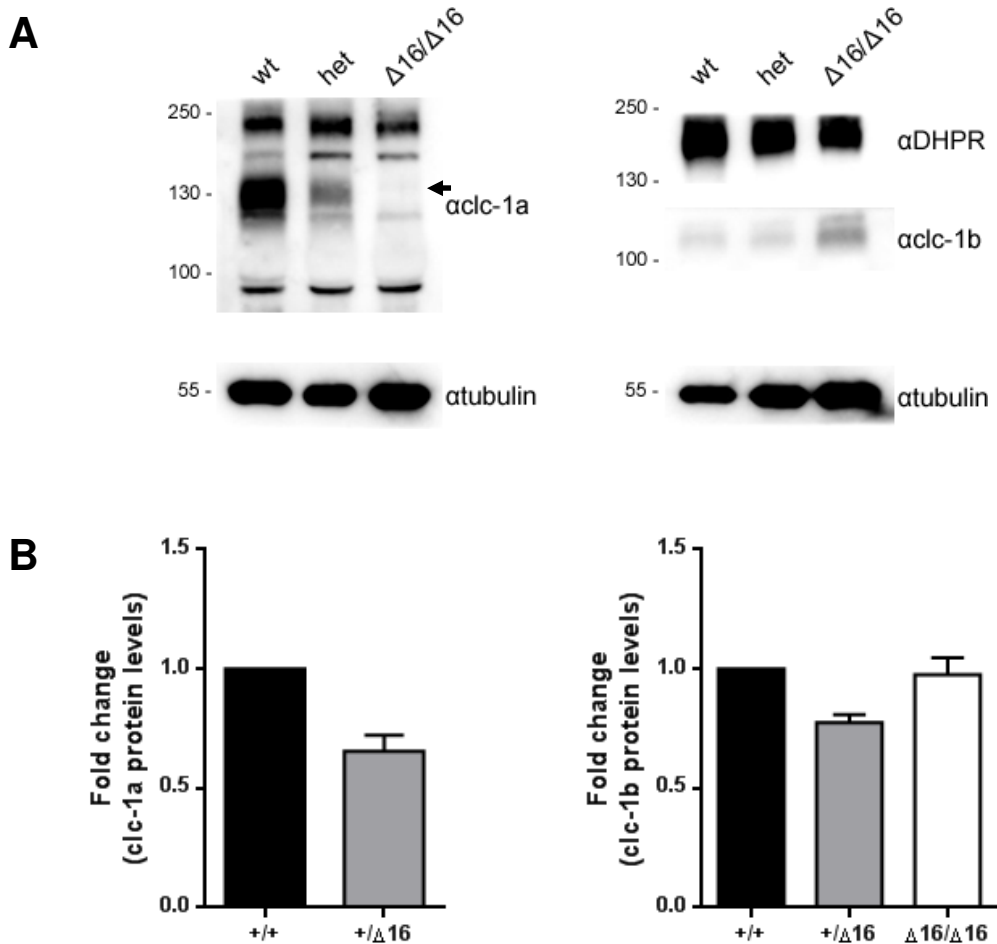


**Figura 71.** Comparació entre extractes de proteïna total i extractes de proteïna de membrana a partir de múscul esquelètic d'animals WT. A l'esquerre s'observa com la senyal per *clc-1a* incrementa en l'extracte enriquit en proteïnes de membrana, igual que el DHPR (a dalt a la dreta). En canvi, la senyal per *clc-1b* és molt tènue (dreta).

En la figura 72A es mostra el resultat obtingut seguint el mateix procediment amb la línia *clcn1a*<sup>Δ16</sup>. S'observa com la banda amb el pes corresponent a *clc-1a* desapareix

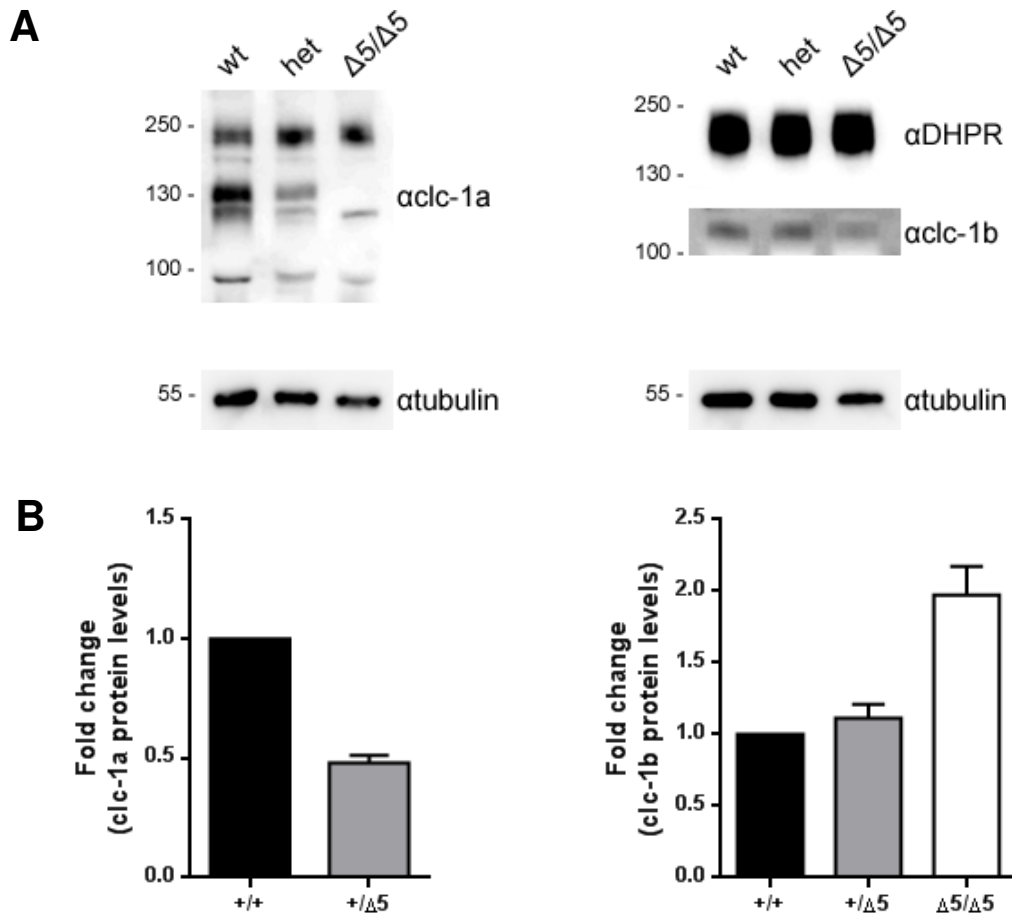


(indicat amb una fletxa), de manera que la resta de senyal present és inespecífica. És interessant observar que els nivells de *clc-1a* en els animals heterozigots són un 65.5% respecte els nivells d'animals WT (Figura 72B), tot i que no arriba a ser significativa. S'observa una senyal molt tènue per *clc-1b* i els nivells d'aquest no varien ni en els animals heterozigots ni en els  $\Delta 16/\Delta 16$ .



**Figura 72.** Anàlisi de les proteïnes *clc-1a* i *clc-1b* en la línia *clcn1a<sup>Δ16</sup>*. **A** A l'esquerre, per Western blot s'observa com la banda amb el pes corresponent a *clc-1a* desapareix, evidenciant que la resta de bandes són inespecificitats. A la dreta es presenten els nivells de DHPR i *clc-1b*, presentant aquest últim uns nivells baixos tant en animals *wild-type*, heterozigots i mutants. En **B** es mostra la caiguda de *clc-1a* fins a un 65.5% en animals heterozigots i com els nivells de *clc-1b* es mantenen.

Vam realitzar el mateix procediment per la línia *clcn1a<sup>Δ5</sup>* (Figura 73A). Tanmateix, s'observa la caiguda dels nivells de *clc-1a* en individus heterozigots a un 48% respecte els *wild-type* (Figura 73B), tot i que no és significativa. És interessant observar com els nivells de *clc-1b* presenten una tendència a incrementar-ne els nivells, però no arriba a ser significativa.



**Figura 73.** Anàlisi de les proteïnes clc-1a i clc-1b en la línia *clcn1a*<sup>Δ5</sup>. **A** A l'esquerra, per Western blot s'observa com la banda amb el pes corresponent a clc-1a desapareix. A la dreta es presenten els nivells de DHPR i clc-1b, presentant aquest últim uns nivells baixos tant en animals *wild-type*, heterozigots i mutants. En **B** es mostra la caiguda de clc-1a fins a un 48% en animals heterozigots i com els nivells de clc-1b es mantenen.

## 2.2 Generació de línies *knock out* per *clcn1b*

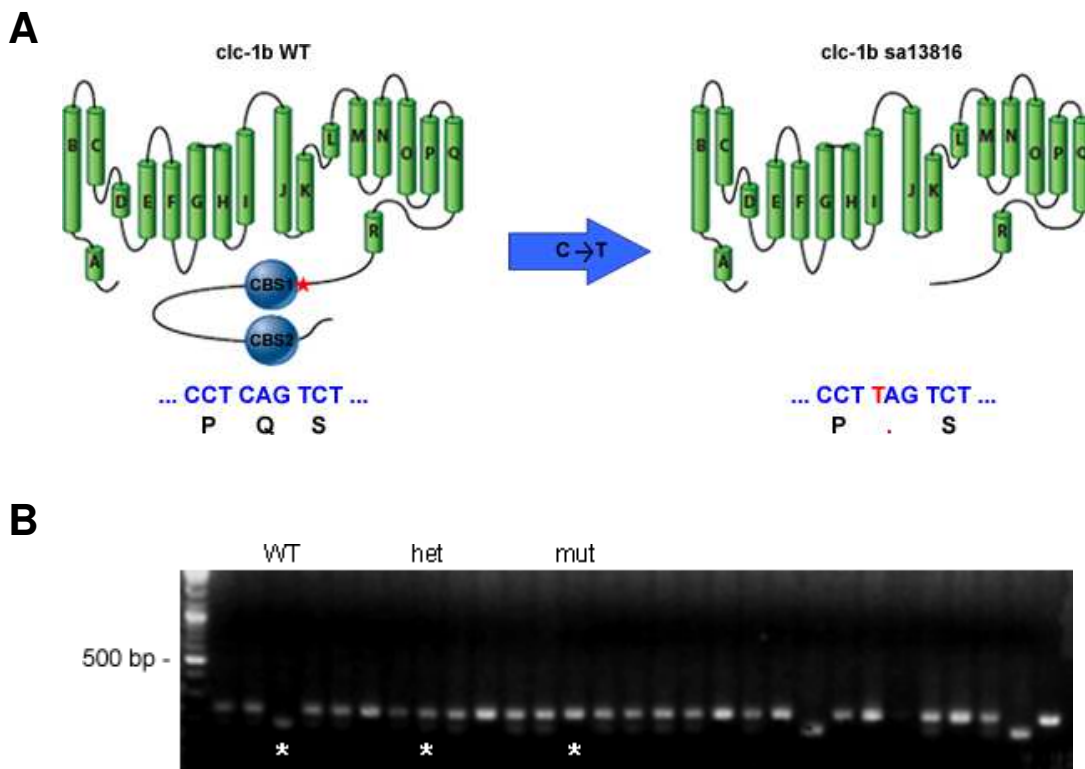
### 2.2.1 Obtenció de l'al·lel *clcn1b*<sup>sa13816</sup>

Buscant a la bases de dades del Zebrafish Mutation Project vam trobar que havien identificat diversos al·lells pel gen *clcn1a* i *clcn1b*, amb mutacions que alteren els llocs d'*splicing* o *nonsense*. No obstant, en aquell moment només hi havia disponible l'al·lel *clcn1b*<sup>sa3816</sup>, el qual vam obtenir.

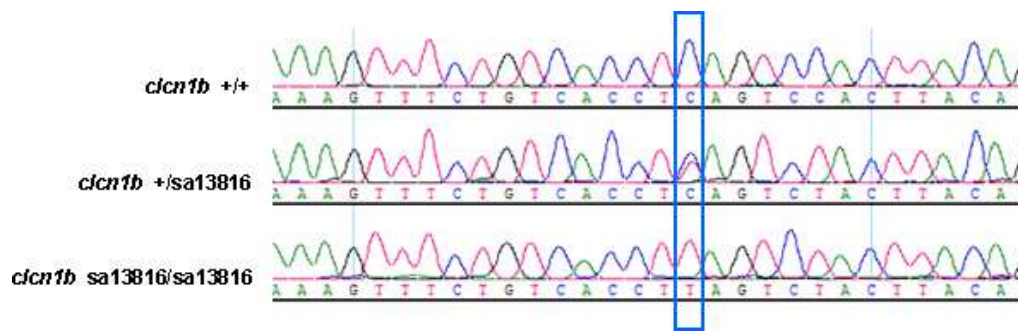
L'al·lel *clcn1b*<sup>sa13816</sup> presenta una mutació puntual, presentant la substitució C→T (nucleòtid 1816 del cDNA) en l'exó 15. A nivell de proteïna, aquesta mutació provoca la substitució d'una glutamina per un codó *stop* en la posició 606 (Q606X), just a l'inici del primer domini CBS (Figura 74A).

Els animals F1 que ens van arribar van ser generats per fertilització *in vitro*, i els vam genotipar per tal d'identificar els individus heterozigots i propagar la línia. Vam seguir

dos mètodes de genotipat, sent el primer el RFLP (**P**olimorfisme de **L**ongitud del **F**ragment de **R**estricció), on aprofitàvem la pèrdua d'un punt de tall per l'enzim de restricció *MnII* degut a la mutació. Un inconvenient de l'ús de ENU com a agent mutagen, és la generació de mutacions aleatòries en diversos *locus* que poden originar alteracions de desenvolupament. Per aquesta raó, vam creuar els F1 heterozigots entre ells per tal d'identificar possibles mutacions recessives amb fenotips evidents i seleccionar aquells que presentin un desenvolupament normal. Un cop identificats aquells animals que no presenten cap defecte en la seva descendència, els vam creuar amb animals WT per tal d'obtenir la generació F2. Seguint el mateix procediment vam identificar els heterozigots i, en aquest cas, vam creuar-los entre ells per tal d'obtenir aproximadament un 25% d'embrions homozigots i comprovar-ne la viabilitat. En la figura 74B es mostra un exemple de genotipat i en 74C es mostra la seqüència d'aquests animals on es pot observar la mutació.

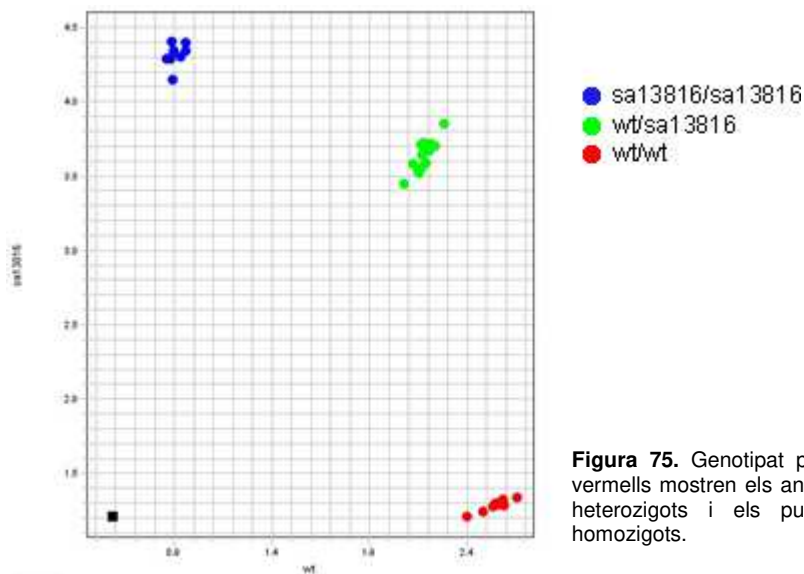


C



**Figura 74.** Identificació de l'al·lel *cln1b*<sup>sa13816</sup>. **A** Topologia típica d'una proteïna CIC on s'indica el lloc de la mutació puntual (estrella vermella) i l'efecte d'aquesta a nivell de seqüència. **B** RFLP on es distingeixen clarament els al·lells WT, heterozigot i mutant, indicats amb un asterisc blanc. **C** Seqüenciació dels tres al·lells on s'observa el doble pic en l'heterozigot i la mutació C→T en el mutant. El rectangle blau indica el lloc de la mutació.

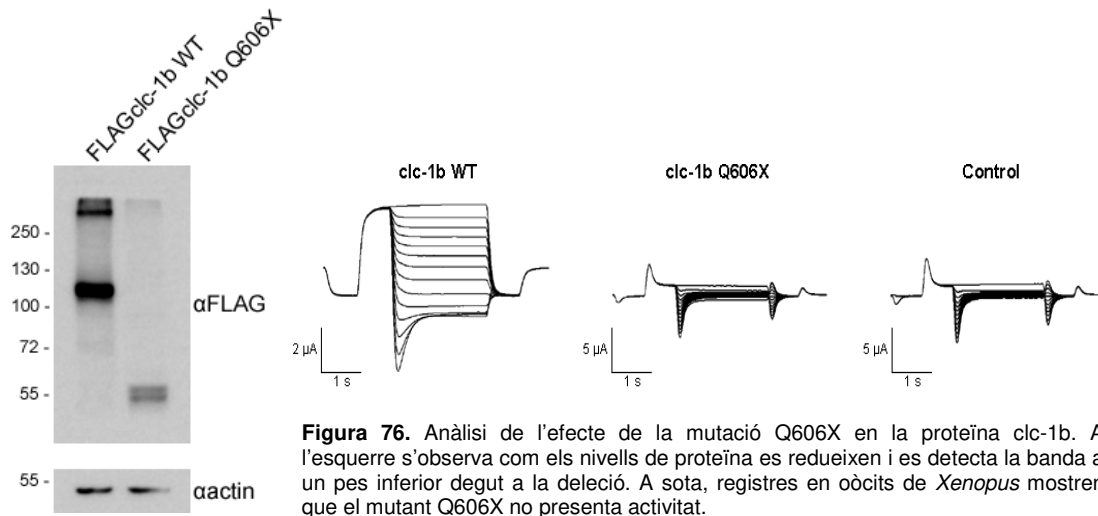
Durant el procés d'obtenció dels mutants, vam decidir provar un altre mètode de genotipat, més ràpid i amb menys probabilitat d'error humà. Vam començar a utilitzar el TaqMan SNP Assay, on amb un sol pas ja podem discriminar els diferents al·lells. A continuació es mostra un exemple de genotipat per TaqMan (Figura 75).



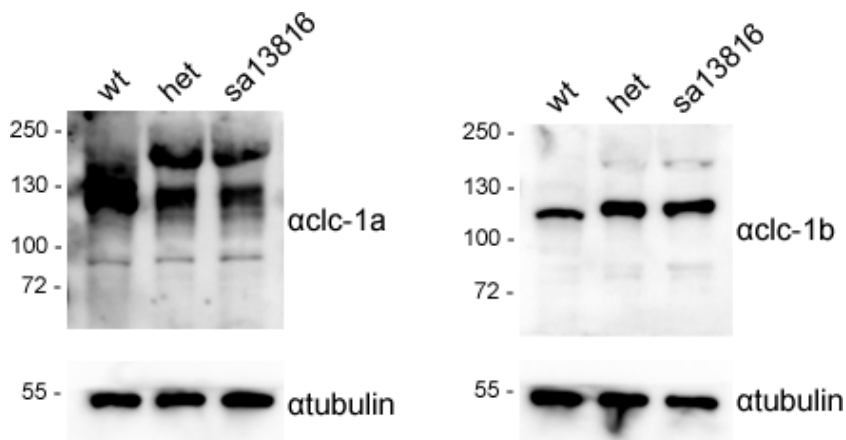
**Figura 75.** Genotipat per TaqMan SNP Assay. Els punts vermells mostren els animals wt, els punts verds mostren els heterozigots i els punts blaus, els mutants sa13816 homozigots.

Paral·lelament, tot i que s'ha demostrat que la pèrdua dels dominis CBS comporta la pèrdua de funció i degradació de les proteïnes CIC (Estévez et al, 2004), vam decidir clonar la mutació Q606X en vectors d'expressió de cèl·lules i comprovar-ne els efectes *in vitro*. La construcció amb FLAG al N-terminal i la detecció amb aquest ens mostra que, efectivament, la pèrdua dels CBS també provoca una reducció important dels nivells de proteïna en peix zebra (Figura 76). A més, es van expressar els RNAs d'aquests constructes en oòcits de *Xenopus* i registrat l'activitat elèctrica d'aquests canals mitjançant la tècnica de *two-electrode voltage clamp* (els experiments

d'electrofisiologia han estat realitzats pel doctorant i company de laboratori Héctor Gaitán).



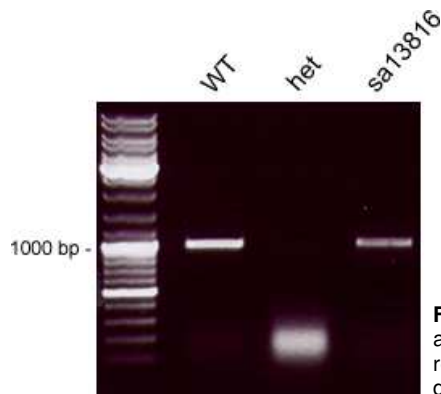
Un cop vam obtenir mutants homozigots adults, vam realitzar un Western blot a partir d'extractes totals de múscul esquelètic per tal d'assegurar la pèrdua de la proteïna a més de validar l'especificitat de l'anticòs. Inesperadament, vam observar senyal en tots els animals (Figura 77).



Al obtenir aquest resultat ens vam plantejar les següents qüestions:

- És possible que s'estigui donant el fenomen d'*exon skipping* i que la línia *clcn1b*<sup>sa13816</sup> no sigui *knock out*?
- O és que l'anticòs no és capaç de detectar la proteïna en extractes totals i veiem només inespecificitats?

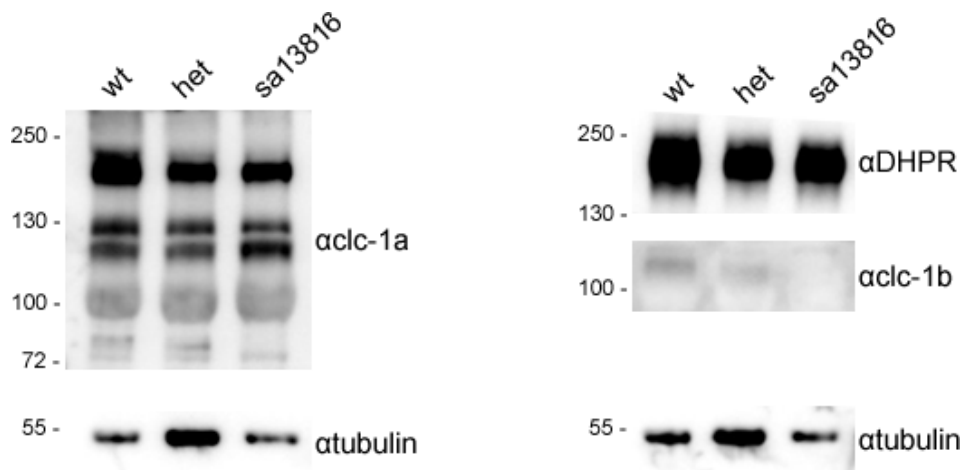
Vam resoldre la primera pregunta mitjançant RT-PCR a partir de RNA de múscul dels mateixos animals. Podem descartar aquest punt al veure com només apareix un sol producte de PCR de la mateixa mida, per tant, no hi ha alteració d'*splicing* (Figura 78).



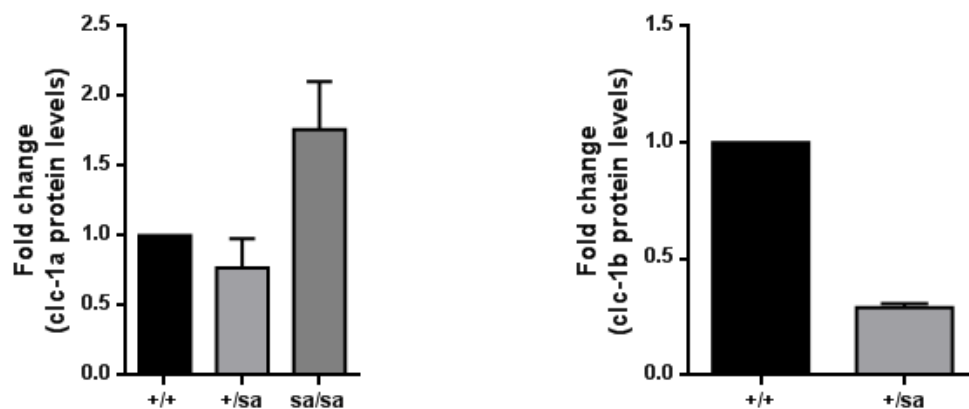
**Figura 78.** RT-PCR a partir de múscul d'animals adults. El fragment esperat amb el parell de primers 1086 Fw i 2057 Rv és de 1000 bp. Les bandes resultants han estat purificades i seqüenciades i s'observa com la seqüència de l'individu sa13816 és idèntica a la del wt.

Vam decidir repetir l'assaig de Western blot de la línia *clcn1b*<sup>sa13816</sup> a partir d'extractes enriquits en la fracció de proteïnes de membrana. En la figura 79A s'observa la manca de clc-1b en animals sa13816/sa13816. En la figura 79B s'observa una caiguda dels nivells de clc-1b d'un 77% en els animals heterozigots i un increment en els nivells de clc-1a en els animals mutants, tot i que no és significatiu.

**A**



**B**



**Figura 79.** Anàlisi de les proteïnes clc-1a i clc-1b en la línia *clcn1b*<sup>sa13816</sup> en extractes de membrana. **A** A la dreta, per Western blot s'observa com la banda amb el pes corresponent a clc-1b desapareix. A l'esquerre es presenten els nivells de clc-1a. En **B** s'observa un increment no significatiu de clc-1a en els animals mutants i una caiguda de clc-1b fins a un 29% en animals heterozigots.

## 2.2.2 Generació de línies *knock out* per *clcn1b* amb CRISPR/Cas

No obstant, ens vam plantejar generar una segona línia mutant per *clcn1b* aprofitant que ja hem aconseguit posar a punt la tècnica de mutagènesi dirigida CRISPR/Cas.

Vam dissenyar dos sgRNA contra els exons 3 i 4 de *clcn1b*. Al provar-los, vam observar que el sgRNA contra l'exó 3 era més eficient, per aquest motiu es va continuar treballant amb aquest.

Vam procedir de la mateixa manera tal com s'explica per *clcn1a*. Breument, els animals injectats es van deixar créixer fins a adults, es van creuar amb animals WT i vam analitzar la generació F1 en busca de mutacions per tal d'identificar fundadors. Es van seqüenciar les F1 positives per HRM i vam identificar dos al·lels interessant, dues deleccions de 7 nucleòtids. En la figura 80A es mostra un esquema amb la seqüència del sgRNA contra l'exó 3 i la seqüència dels dos al·lels seleccionats a nivell de DNA genòmic. Els dos al·lels, anomenats 7.1 i 7.2 (Figura 80B), provoquen un canvi en la pauta de lectura a partir dels aminoàcids en les posicions 139 i 141, respectivament. Ambdós al·lels acaben resultant en un codó stop en la posició 170.

### A



### B

<i>clcn1b</i> WT	...YKWMYGELKGNVALQYLAWVSYPIILVVFASLFCHLVAP...	940 aa
<i>clcn1b</i> Δ7.1	...YKWMYGEI[W]LCSIWHGFHIPPSSSFLHPPFSVIWLLHKL.	169 aa
<i>clcn1b</i> Δ7.2	...YKWMYGELKG[C]SIWHGFHIPPSSSFLHPPFSVIWLLHKL.	169 aa

**Figura 80.** Generació de mutants de *clcn1b* amb CRISPR. **A** Topologia típica de les proteïnes CIC on s'indica la diana pel sgRNA contra l'exó 3 de *clcn1b* indicat per un asterisc blau. A la dreta es mostra la seqüència genòmica WT i les dues deleccions de 7 nucleòtids. En verd s'indica el sgRNA. En vermell s'indica la PAM. **B** Seqüència de la proteïna WT i de les dues deleccions de 7 nucleòtids. Ressaltat en vermell s'indica el primer residu en el qual es produeix un canvi en la pauta de lectura.

Actualment disposem d'animals adults però encara no s'han pogut testar per Western blot.

### 2.3 Generació d'una línia *knock out* doble per *clcn1a* i *clcn1b*

A més de la generació de línies *knock out* per *clcn1a* o *clcn1b*, estem generant una línia *knock out* doble *clcn1a*<sup>-/-</sup> *clcn1b*<sup>-/-</sup>. Per fer-ho, hem injectat el sgRNA de *clcn1b* contra l'exó 3 en un *incross* tant de la línia *clcn1a*<sup>Δ5</sup> com *clcn1a*<sup>Δ16</sup>. Un cop adults, els vam genotipar i ens vam quedar amb els homozigots mutants de les dues línies de *clcn1a*. Seguidament, es van creuar per detectar mutacions en la descendència i així identificar fundadors. De la mateixa manera que s'explica anteriorment en la generació de mutants amb CRISPR, es seqüencien els productes de PCR positius per HRM. En la figura 81A es mostra la mutació més interessant escollida detectada en la línia *clcn1a*<sup>Δ5</sup>. En la figura 81B es mostra la seqüència a nivell de proteïna, on s'observa un canvi en la pauta de lectura i l'aparició d'un codó *stop* prematur.

#### A

```

clcn1b WT      TATGGAGAGCTGAAGGGGAATGTGGCTTTGC
clcn1b Δ14    TATGGATG-----TGGCTTTGC
  
```

#### B

```

clcn1b WT      ...YKWMYGELKGNVALQYLAWVSYPIILVVVFASLFCHLVAP... 940 aa
clcn1b Δ14    ...YKWMYG■GFAVSGMGFISHHPRRFCIPFLSFGCSTSYRLWDS. 172 aa
  
```

**Figura 81.** Generació del doble mutant de *clcn1* amb CRISPR. **A** Seqüència genòmica WT i la deleció de 14 nucleòtids en el gen *clcn1b*. En verd s'indica el sgRNA. En vermell s'indica la PAM. **B** Seqüència de la proteïna WT i de la deleció de 14 nucleòtids. Ressaltat en vermell s'indica el primer residu en el qual es produeix un canvi en la pauta de lectura.

La generació de la línia doble mutant per *clcn1* està en progrés i encara no s'ha pogut testar per Western blot.





**Capítol 4.**  
**Estudis de comportament en larves**



Per tal de discernir si els animals mutants generats tenen alteracions motores és necessari desenvolupar metodologies que permetin l'estudi del comportament motor, en aquest cas, en estadi larvari. Alguns laboratoris han desenvolupat els seus propis sistemes de registre però recentment, diverses cases comercials han dissenyat aparells que faciliten la realització dels experiments de comportament i el seu posterior anàlisi. Vam adquirir l'aparell Zebrabox (ViewPoint), el qual permet el registre simultani d'entre 24 i 96 larves alhora. A més, la possibilitat de generar estímuls lluminosos o de vibració donen opció a realitzar diversos tipus d'experiments.

Els pacients amb miotonia són capaços de realitzar certs moviments de la mateixa manera que un individu sa, com podria ser caminar, i manifesten fenotip al realitzar moviments bruscos o que requereixen d'esforç, com podria ser córrer o pujar unes escales. Per aquesta raó ens vam plantejar realitzar dos tipus d'experiments: un primer període sense estímuls per estudiar el moviment espontani de les larves mentre que en el segon tipus apliquem una sèrie de repeticions d'estímuls de vibració seguits per períodes de descans.

## **1. Desenvolupament d'un protocol amb estímuls adequat**

Fixant la primera part de l'experiment a observació de 30 minuts per estudiar el moviment espontani, vam decidir testar protocols variant el temps de duració dels estímuls i dels períodes de repòs amb animals WT. Els estímuls generats presenten una amplitud de 50 Hz i els protocols dissenyats són els següents:

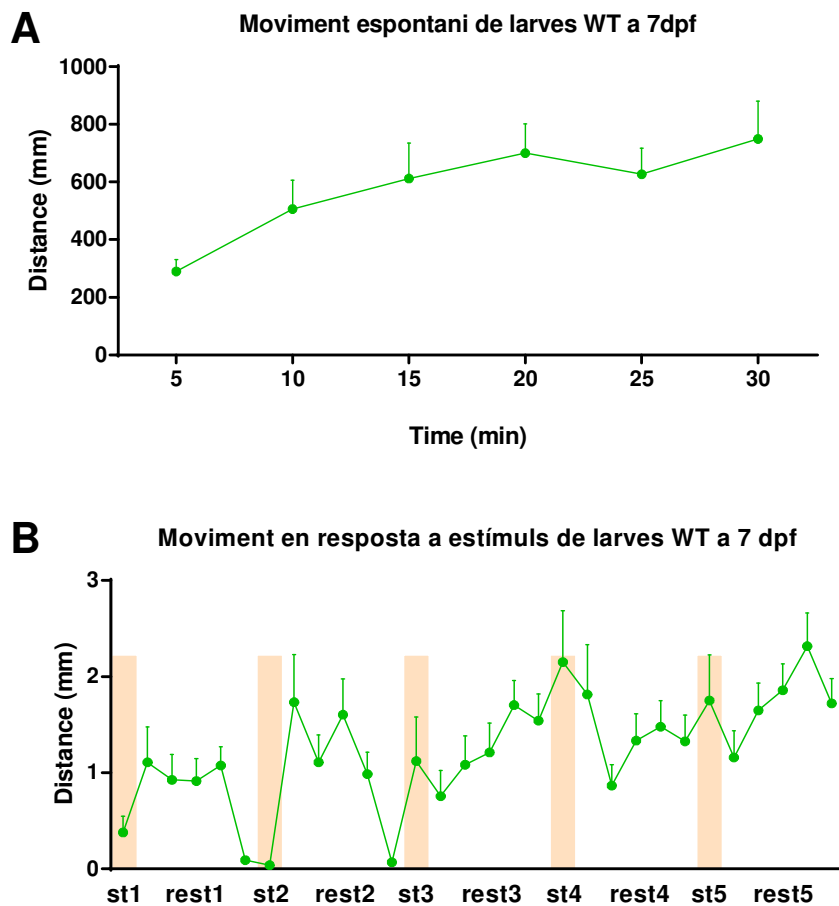
- Període de 30 minuts
- Protocol 1: 1 segon d'estímul, seguit de 5 segons de repòs (x5 repeticions)
- Protocol 2: 2 segons d'estímul, seguits de 5 segons de repòs (x5 repeticions)

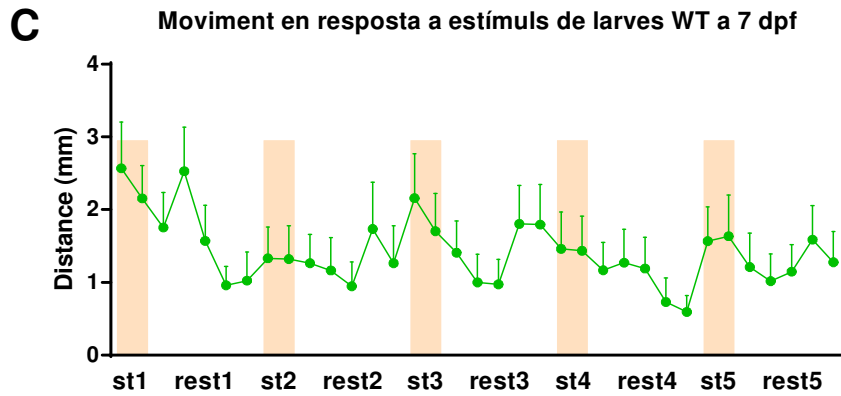
A més, vam provar els tres protocols en diferents estadis larvaris per tal d'establir el moment òptim, és a dir, que les larves presentin un bon nivell d'activitat i resposta al estímuls, per l'estudi de la miotonia en els animals mutants. Vam provar a 3, 4 i 7 dpf.

Ràpidament vam establir que era millor realitzar els experiments a 7 dpf perquè, tot i que a 3 i 4 dpf les larves presenten una alta activitat en les plaques de Petri en les quals es mantenen a l'incubador, al estar aïllades en els pous de plaques de 24 pous presenten una activitat mínima que fa impossible l'estudi d'un fenotip motor que pensem provocaria una disminució en l'activitat natatòria. Aquests resultats estan d'acord amb els estudis de Padilla et al (Padilla et al, 2011) en el qual analitzen el

moviment de larves a 4, 5 i 6 dpf i observen grans diferències en l'activitat que presenten, sent especialment evident als 6 dpf.

El primer període de 30 minuts s'ha analitzat representant la distància total en períodes de 5 minuts. S'observa com les larves *wild-type* a 7 dpf presenten un alt nivell d'activitat des de l'inici de l'experiment amb una tendència a l'alça i aquesta es manté al llarg dels 30 minuts (Figura 82A). Per tal de discernir diferències en la distància recorreguda durant el període d'estímuls, es va decidir analitzar la distància total recorreguda en cada segon. És interessant destacar que els estímuls incrementen l'activitat motora de les larves. S'observa un increment en la distància total recorreguda durant l'estímul, ja sigui el d'un segon de durada (Figura 82B) com el de dos segons (Figura 82C).

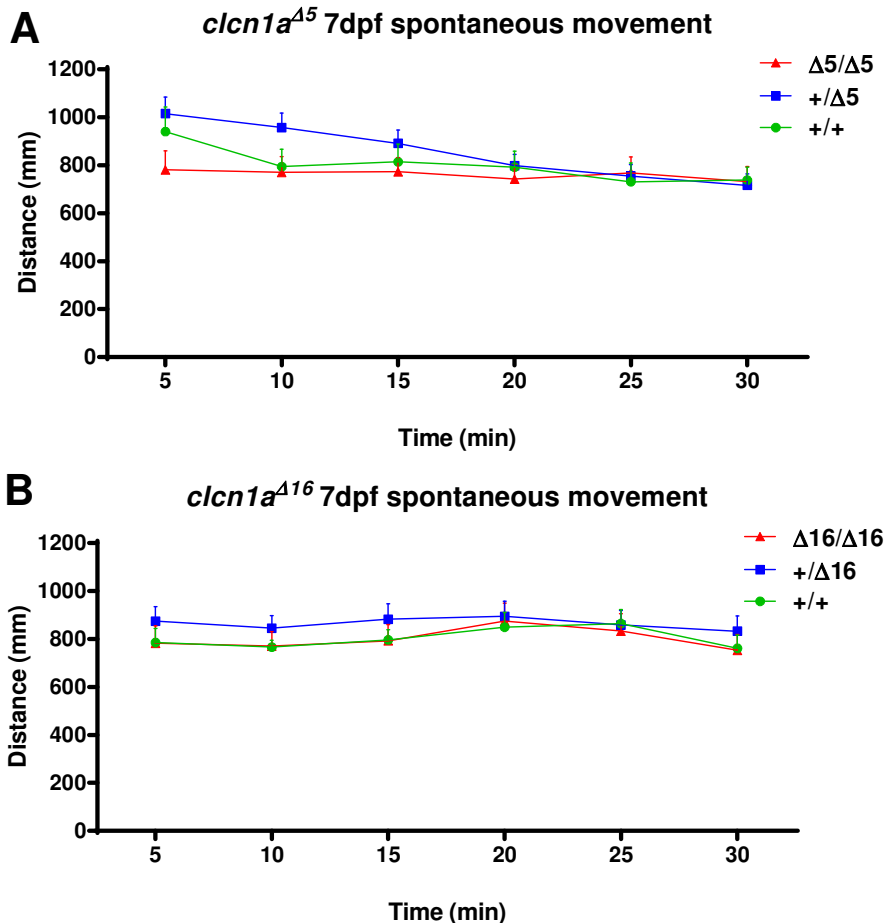


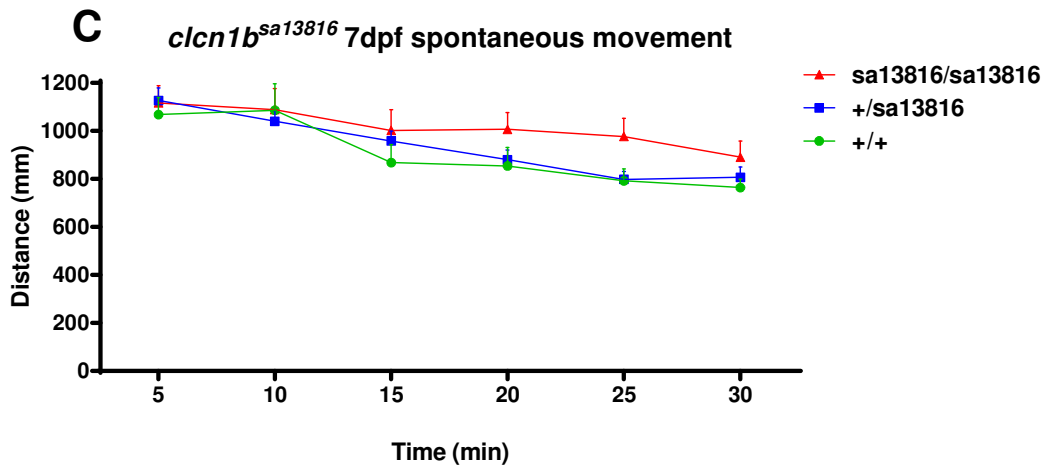


**Figura 82.** Estudi de comportament en larves WT de 7 dpf. Observant el moviment espontani (A) durant un període de 30 minuts sense estímuls, es veu com a 7 dpf presenten una gran activitat motora. Cada punt indica la distància mitjana recorreguda en un període de 5 minuts. S'observa un increment en la distància total recorreguda a l'inici de l'estímul d'un segon (B) i de dos segons (C), i com continuen responenent a aquests fins al final de l'experiment. Cada punt representa la distància mitjana recorreguda durant un segon. Els rectangles vermells indiquen els períodes d'estimulació. En cada experiment s'ha analitzat 24 larves *wild-type*.

## 2. Estudi del moviment de les línies mutants

L'anàlisi del moviment espontani durant 30 minuts de les larves a 7dpf de les línies *clcn1a<sup>Δ5</sup>*, *clcn1a<sup>Δ16</sup>* i *clcn1b<sup>sa13816</sup>* (Figura 83A, B i C, respectivament) mostra que aquests individus presenten una activitat motora espontània normal, comportant-se de la mateixa manera tant els individus *wild-type*, com heterozigots com els *knock out*.

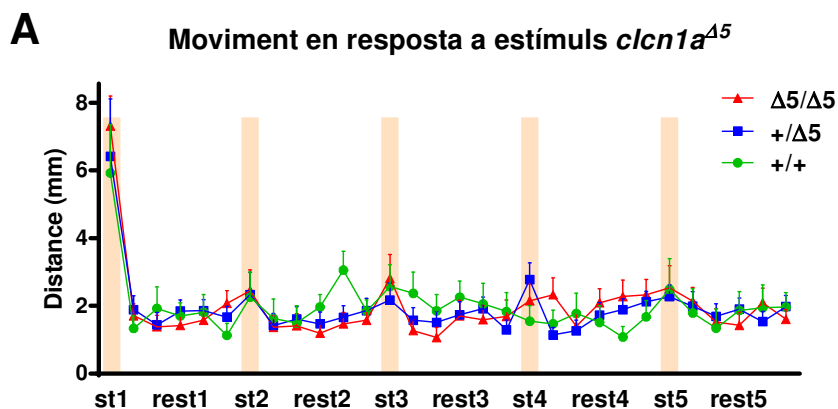


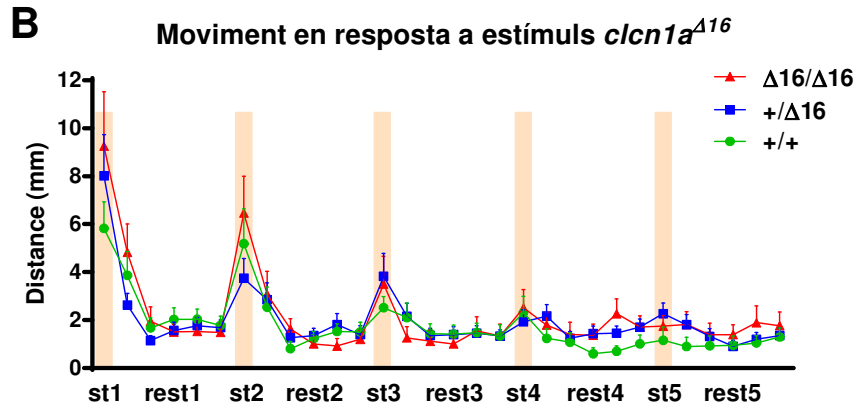


**Figura 83.** Moviment espontani en larves de 7 dpf de les línies *clcn1a<sup>Δ5</sup>* (A), *clcn1a<sup>Δ16</sup>* (B) i *clcn1b<sup>sa13816</sup>* (C) durant 30 minuts sense estímuls. S'observa com els animals de les tres línies mutants presenten una alta activitat motora des de l'inici de l'experiment i es manté al llarg dels 30 minuts. Es mostra els resultats obtinguts a partir de 27 *wild-type*, 47 heterozigots i 21 mutants per la línia *clcn1a<sup>Δ5</sup>*, 30 *wild-type*, 42 heterozigots i 24 mutants per la línia *clcn1a<sup>Δ16</sup>* i 18 *wild-type*, 34 heterozigots i 20 mutants per la línia *clcn1b<sup>sa13816</sup>*.

Els animals de les tres línies presenten una activitat motora similar i estable, és a dir, no s'observa una caiguda o un increment dràstics, durant l'experiment i fins al final d'aquest.

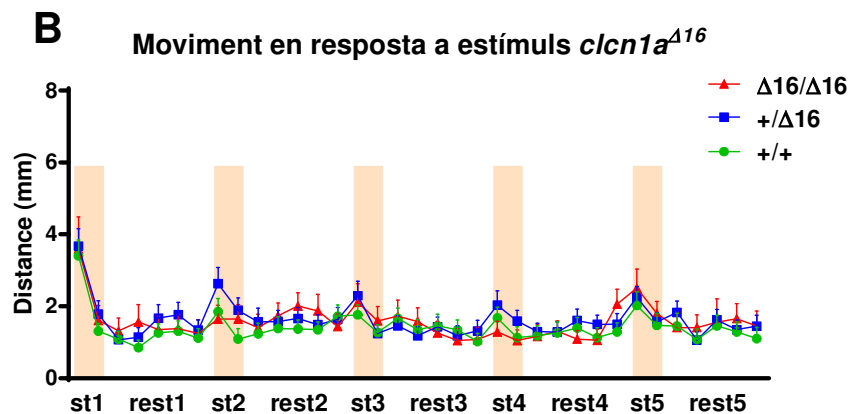
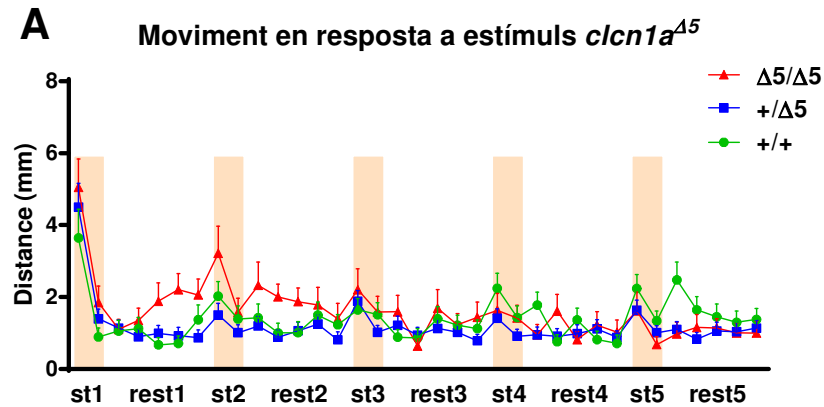
Seguidament vam aplicar els protocols d'estímuls i vam analitzar-ne el seu comportament. Al aplicar el protocol 1 (un segon d'estímul seguit de 5 segons de repòs) s'observa un petit increment en l'activitat durant el moment de l'estímul, però no s'aprecien diferències entre els individus *wild-type*, heterozigots i *knock outs*, tant per la línia *clcn1a<sup>Δ5</sup>* com la línia *clcn1a<sup>Δ16</sup>* (Figura 84A i B, respectivament). Tot i que responen als 5 estímuls aplicat, aquesta resposta tendeix a ser menor en el cinquè estímul.



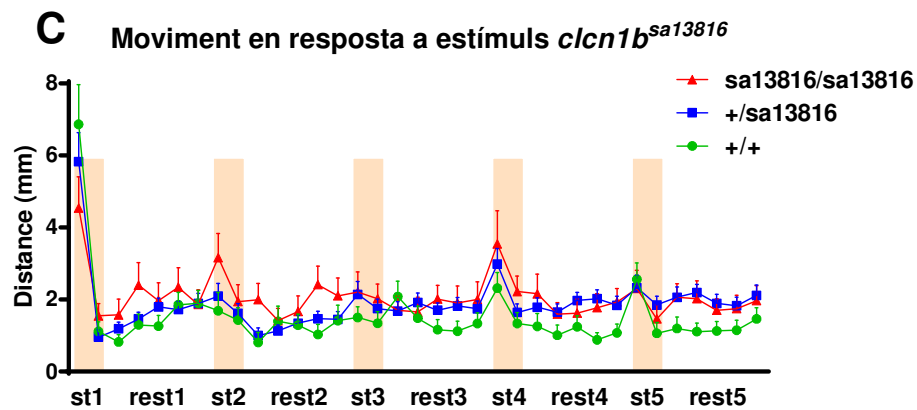


**Figura 84.** Moviment en resposta a estímuls d'un segon i períodes de repòs de 5 segons (5 repeticions) en larves *clcn1a*<sup>Δ5</sup> (A) i *clcn1a*<sup>Δ16</sup> (B). En ambdós casos, tots els animals responen als 5 estímuls. Es mostra els resultats obtinguts a partir de 9 *wild-type*, 22 heterozigots i 17 mutants per la línia *clcn1a*<sup>Δ5</sup> i 14 *wild-type*, 23 heterozigots i 11 mutants per la línia *clcn1a*<sup>Δ16</sup>. Els rectangles vermells indiquen els períodes d'estimulació.

Al aplicar el protocol 2 (dos segons d'estímul seguit de 5 segons de repòs) s'observa com tampoc hi ha diferències en els individus *knock out* de les línies *clcn1a*<sup>Δ5</sup>, *clcn1a*<sup>Δ16</sup> i *clcn1b*<sup>sa13816</sup>, respecte els animals *wild-type* i heterozigots (Figura 85A, B i C, respectivament). No obstant, a diferència de l'estímul d'un segon, les respostes obtingudes durant els cinc estímuls presenten uns nivells més similars.







**Figura 85.** Moviment en resposta a estímuls de dos segons i períodes de repòs de 5 segons (5 repeticions) en larves *clcn1a*<sup>Δ5</sup> (A), *clcn1a*<sup>Δ16</sup> (B) i *clcn1b*<sup>sa13816</sup> (C). En les tres línies, tots els animals responen als 5 estímuls. Es mostra els resultats obtinguts a partir de 27 *wild-type*, 47 heterozigots i 24 mutants per la línia *clcn1a*<sup>Δ5</sup>, 30 *wild-type*, 42 heterozigots i 24 mutants per la línia *clcn1a*<sup>Δ16</sup> i 18 *wild-type*, 34 heterozigots i 20 mutants per la línia *clcn1b*<sup>sa13816</sup>. Els rectangles vermells indiquen els períodes d'estimulació.

Aparentment no hi ha alteracions motores en les larves de les línies *clcn1a*<sup>Δ5</sup>, *clcn1a*<sup>Δ16</sup> i *clcn1b*<sup>sa13816</sup> en l'estadi de 7 dpf. Futurs estudis en la línia *clcn1* nul·la seran interessants per tal d'elucidar si el peix zebra manifesta alteracions motores similars a les observades en pacients amb miotonia congènita i per tal, ser utilitzat com a model d'aquesta.

# DISCUSSIÓ



En la realització d'aquesta tesi s'ha identificat i iniciat la caracterització de les proteïnes CIC del peix zebra. A més s'han generat al·lels de pèrdua de funció per les proteïnes *clc-1* amb l'esperança d'avançar en la cerca d'un tractament per la Miotonia congènita.

### **Identificació i caracterització de les proteïnes *clc* de peix zebra**

En aquesta tesi s'han identificat i contribuït en la caracterització dels diferents canals *clc* del peix zebra. Com és d'esperar, presenten dos gens ortòlegs per *CLCN1* degut a la duplicació genòmica que va patir l'ancestre comú dels teleostis. En canvi, la còpia única de *CLCNK* implicaria una duplicació en l'ancestre dels mamífers degut a l'adaptació a la vida terrestre. No obstant, resulta interessant el nombre de gens *CLCN2* en el genoma dels teleostis. El fenomen de la duplicació genòmica esmentat anteriorment ha resultat en què aproximadament un 70% de tots els gens dels teleostis presenten dos paràlegs (Howe et al, 2013). La preservació de gens duplicats es pot explicar gràcies al mecanisme de subfuncionalització, és a dir, en el qual els gens paràlegs mostren patrons d'expressió diferencials (Force et al, 1999).

Aquest podria ser el cas dels gens *clcn2a* i *clcn2b*. Són els més similars a nivell de seqüència de proteïna al canal CIC-2 de mamífer, sent molt probable que s'hagin originat degut a la duplicació genòmica. El canal CIC-2 és ubic, és a dir, es troba en gran varietat de teixits mentre que *clcn2a* s'expressa majoritàriament en cervell, ull i cor adults i *clcn2b* presenta una expressió similar en tots els teixits analitzats. Aquests resultats suggereixen que el canal *clc-2a* és molt més abundant en teixits excitable, on les corrents de CIC-2 tindrien un paper regulador de l'excitabilitat neuronal (Foldy et al, 2010; Ratte i Prescott, 2011; Rinke et al, 2010) o de l'activitat marcapassos del teixit cardíac (Huang et al, 2000). D'altra banda, *clc-2b* podria ser el responsable de les corrents basals de clorur necessàries per les funcions cel·lulars bàsiques. Durant el desenvolupament embrionari, *clcn2b* s'expressa en el túbul contornejat proximal del pronefros, diferint de la regió de *clcnk* el qual es troba al túbul distal. De la mateixa manera, en el ronyó de mamífers, CIC-2 es troba en el túbul proximal (Obermuller et al, 1998) mentre que els canals CIC-Ka i CIC-Kb es troben en la nança de Henle, el túbul contornejat i tub col·lector (Kieferle et al, 1994; Kobayashi et al, 2001).

El tercer *clcn2*, *clcn2c*, va sorgir d'un fenomen de duplicació gènica únic, suggerit per la seva localització genòmica en tàndem amb *clcn2b*. No és un fenomen aïllat ja que també s'ha observat per altres gens com l'aquaporina *aqp8*, del qual el genoma del peix zebra presenta els gens *aqp8aa* i *aqp8ab* en tàndem al cromosoma 12 i el gen *aqp8b* al cromosoma 3 (Tingaud-Sequeira et al, 2010). L'expressió de *clcn2c* és

restringida durant el desenvolupament embrionari en un tipus cel·lular específic de teleostis, els ionocits, i en les brànquies en l'animal adult. Aquestes cèl·lules són responsables de la homeòstasi iònica tant en peixos d'aigua dolça com salada (Dymowska et al, 2012). S'han descrit diferents tipus d'ionocits, classificats segons els canals iònics i transportadors que expressen. Un d'aquests tipus són les cèl·lules anomenades NCC, implicades en la captació de  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$  i caracteritzats per l'expressió del cotransportador de  $\text{Na}^+-\text{Cl}^-$  NCC-like 2 (*slc12a10.2*). Durant temps s'ha hipotetitzat que aquestes cèl·lules han d'expressar un canal de clorur en la membrana basolateral. Tot i que s'ha implicat el transportador intracel·lular de  $\text{Cl}^--\text{H}^+$  CIC-3 en osmoregulació en altres peixos (Bossus et al, 2013), el patró d'expressió de *clcn2c* encaixa amb la distribució dels ionocits NCC (Wang et al, 2009). Així doncs, el canal *clc-2c* podria ser aquest canal basolateral responsable de la captació de clorur en teleostis.

La proteïna *clc-2c* és la més divergent de les tres proteïnes *clc-2* del peix zebra en quant a similaritat en la seqüència de proteïna, no obstant, comparteix característiques amb altres membres CIC-2 i dú a terme funcions específiques de teleostis. L'allargada de les branques de l'arbre filogenètic on s'agrupen els *clc-2c* suggereix que, després de la duplicació, va seguir un camí evolutiu ràpid i independent en els llinatges de teleostis analitzats: Characiformes (tetra mexicana), Perciformes (tilapia del Nil) i Cypriniformes (peix zebra), sent tots ells d'aigua dolça. S'ha descrit que hi ha diferències en gens implicats en l'adaptació a l'aigua dolça inclòs entre diferents poblacions dins la mateixa espècie (DeFaveri et al, 2011), fenomen que podria explicar les diferències de seqüència entre ells.

Com es menciona anteriorment, els gens *clcn2* del peix zebra presenten patrons d'expressió en diferents teixits i propietats electrofisiològiques diferents, en canvi, no sembla aquest l'escenari dels gens *clcn1*. Segons els nostres resultats, ambdós gens s'expressen en el mateix teixit, el múscul esquelètic, i presenten unes propietats funcionals molt similars. En aquest cas, el fenomen de subfuncionalització podria venir donat per una diferent distribució subcel·lular dins una mateixa fibra muscular.

Aquesta és una qüestió que avui dia continua en debat, hi ha grups que mantenen afirmant una localització exclusiva al sarcolema mentre que altres laboratoris asseguren. Registres de *patch clamp* en fibres musculars de ratolí demostren que la major part de la conductància de clorur es troba en la superfície de les fibres, és a dir, al sarcolema i no als túbuls T (Lueck et al, 2010). Tot i que la presència de

CIC-1 als túbuls podria ser possible teòricament, els diferents autors s'han trobat amb dificultats d'analitzar-ne la presència degut a un difícil accés als túbuls T per realitzar registres electrofisiològics o d'accessibilitat d'anticossos. No obstant, el tractament de fibres musculars amb glicerol o formamida permet destubularitzar (Bretag, 1987), extreure els túbuls T e les fibres, i estudiar-ne la conductància de clorur restant. D'aquesta manera, indirectament es podria discernir si CIC-1 es localitza als túbuls en cas que s'observessin canvis en la conductància. Seguint aquest procediment, els autors no observen cap canvi en la magnitud de les corrents macroscòpiques, suggerint doncs una localització única al sarcolema (Lueck et al, 2010). En canvi, altres grups aplicant el tractament amb glicerol asseguren que l'activitat CIC-1 és predominant als túbuls T (Palade i Barchi, 1977). No obstant, aquest tractament s'hauria d'aplicar i interpretar amb cura degut a possibles efectes no específics (Bretag, 1987).

Enmig d'aquesta controvèrsia, ens trobem amb la diferent localització subcel·lular de les proteïnes clc-1a i clc-1b. Mentre que la primera presenta una localització predominant al sarcolema, la localització exacte de clc-1b roman desconeguda. No obstant, el patró bandejat rodejant els túbuls suggereix que es podria tractar de les tríades i que per tant, clc-1b es localitzés a les cisternes del reticle sarcoplàsmic. En cardiomiòcits s'ha identificat la presència de canals de clorur en la membrana del reticle sarcoplàsmic (Tanifuji et al, 1987; Decrouy et al, 1996) les corrents del qual són activades per voltatges despolaritzants i inhibides per tamoxifen (Beca et al, 2008). La seva funció no és del tot clara però s'ha observat com la inhibició per tamoxifen també inhibeix l'alliberació de calci a través de la bomba de calci ATPasa (SERCA) del reticle sarcoplàsmic (Kargacin et al, 2000). No obstant, els canals clc-1 s'expressen només en el múscul esquelètic tant de mamífers com dels peix zebra, descartant doncs aquesta possibilitat. A més, per tal de confirmar la localització exacte són necessaris futurs experiments de colocalització amb diferents marcadors i l'ús de controls adequats.

A nivell electrofisiològic, hem identificat que clc-2a presenta unes propietats funcionals que no s'han descrit per altres canals CIC, com la ràpida inactivació a voltatges positius i una ràpida activació a voltatges negatius. Estudis comparatius d'estructura-funció amb aquest canal serien útils per entendre les propietats funcionals del *common gating*, el qual encara no està ben entès.

A més, també hem identificat que *clc-2b* és el primer canal de la família CIC del qual la rectificació en la relació corrent-voltatge no és modificada per GlialCAM. De la mateixa manera que en el cas anterior, estudis d'estructura-funció amb aquest canal podrien ajudar a elucidar els residus de CIC-2 necessaris per la interacció amb GlialCAM.

No hem pogut demostrar que *clc-2c* sigui funcional. Una raó podria ser degut als baixos nivells de proteïna detectats al transfectar cèl·lules HeLa. La coexpressió amb GlialCAM o Barttin tampoc aconsegueix generar corrents. Donada la seva funció específica pels teleostis, *clc-2c* potser necessita d'un estímul desconegut per la seva activació o, de la mateixa manera que altres proteïnes CIC, necessita interaccionar amb una subunitat reguladora per ara desconeguda.

### **Conservació de la interacció amb les subunitats de les proteïnes CIC**

Algunes de les proteïnes CIC necessiten de subunitats que modifiquen la seva localització cel·lular i les propietats biofísiques. La proteïna GlialCAM s'ha identificat com a subunitat de CIC-2 i MLC1 en cèl·lules glijals (Jeworutzki et al, 2012; López-Hernández et al, 2011). La seva funció *in vivo* es va demostrar gràcies al ratolí *knockout* de *GLIALCAM*, on s'observa la deslocalització de CIC-2 en la glia de Bergmann (Hoegg-Beiler et al, 2014). No obstant, *in vitro*, és capaç d'interaccionar amb altres membres de la família CIC, com CIC-0, CIC-1 i CIC-K/Barttin (Jeworutzki et al, 2014) a més de CIC-2 de *Drosophila*, genoma del qual no presenta cap ortòleg per GlialCAM. Durant aquesta tesi, hem identificat que GlialCAM és capaç de dirigir la localització de tots els *clc-2* de peix zebra a les unions cel·lulars en cèl·lules en cultiu. A més de modificar-ne el tràfic, també canvia les corrents de CIC-2. No obstant, només s'han observat canvis en el *common gating* pel canal *clc-2a*, mentre que per *clc-2b* només s'observa un petit increment en les corrents i mai hem pogut registrar activitat per *clc-2c*.

Els canals CIC-K requereixen de Barttin per inserir-se a la membrana i esdevenir funcionals (Estévez et al, 2001). Durant aquesta tesi hem demostrat que la interacció CIC-K/Barttin es conserva en el peix zebra. Ambdúes proteïnes de peix tenen la capacitat d'interaccionar amb les de mamífer. És interessant observar l'efecte estabilitzador evitant la degradació dels canals rCIC-K1 i *clc-k* en presència de Barttin, tant la del peix zebra com la humana. A més de nivell bioquímic, seria interessant estudiar les possibles diferències a nivell funcional ja que el peix zebra no requereix concentrar la orina com els mamífers, raó per la qual no presenta els segments de la nança de Henle (Wingert i Davidson, 2008).

### Conservació evolutiva a nivell genòmic

La genòmica comparada és essencial per entendre com els genomes han evolucionat. Per això, sovint es realitzen estudis de sintènia. Aquest tipus d'estudi consisteix en discernir el grau de preservació comparant grups de gens que es troben en una mateixa regió cromosòmica en genomes de diferents espècies (Huynen i Bork, 1998). Organismes que comparteixen un ancestre comú i que han divergit relativament recentment, presenten relacions sintèniques, és a dir, comparteixen blocs de gens en la mateixa posició i habitualment en el mateix ordre. Durant el procés evolutiu, reordenaments cromosòmics com les translocacions poden trencar o generar relacions sintèniques (Ehrlich et al, 1997; Ferguson-Smith i Trifonov, 2007). En aquesta tesi, durant el procés d'identificació dels gens *clcn* en el genoma del peix zebra s'ha realitzat un estudi de sintènia juntament amb els genomes de ratolí, humà i dues espècies de teleostis, la tilapia del Nil i el tetra mexicà. La comparació de blocs de gens per *clcn1*, mostren una forta sintènia dins els mamífers analitzats i dins els teleostis, però no entre mamífers i teleostis. En els genomes dels mamífers, el gen *CLCN1* es troba envoltat per *FAM131B*, *EPHB6* i *EPHA1*. En els tres teleostis, els gens *clcn1* també va acompanyats del gen *fam131b*, el qual està duplicat. El gen *FAM131B*, pertany a la família amb similaritat de seqüència 131 membre B, i s'ha relacionat amb gliomes pediàtrics a través d'un increment de la senyalització per MAPK (Cin et al, 2011; Roth et al, 2015). En canvi, no presenten els gens *EPHB6* i *EPHA1*, probablement degut a camins evolutius divergents entre mamífers i teleostis. Els genomes de les tres espècies de peix presenten els gens *gadph* i *vamp1*. El primer catalitza la reacció de gliceraldehid-3-fosfat a D-glicerat 1,3-bifosfat durant la glucòlisi i el segon és una proteïna que es troba en la membrana de les vesícules sinàptiques i participa en l'exocitosi d'aquestes (Trimble et al, 1988).

Respecte els canals CIC-K, són 100% sintènics. Tant en mamífers com en teleostis, es troben envoltats pels gens *HSPB7*, *FAM131C* i *EPHA2*, sent una proteïna en resposta a estrès cel·lular, una proteïna miriostoilada al N-terminal i un receptor d'efrina implicat en processos de desenvolupament, respectivament (Kappé et al, 2003; Takamitsu et al, 2015; Naruse-Nakajima et al, 2001).

En canvi, l'escenari que presenten els CIC-2 és totalment oposat. No s'observa una sintènia aparent, ni entre els teleostis. No obstant, tant els mamífers com el peix zebra i el tetra presenten els gens *CHD*, *FAM131A* i *EIF4G1*. *CHD* és un antagonista de BMPs i participa en el procés de dorsalització durant el desenvolupament embrionari



(Sasai et al, 1994). *EIF4G1* interacciona amb altres factors de traducció facilitant el reclutament del mRNA per part del ribosoma (Wells et al, 1998).

És interessant destacar que a nivell genòmic, els canals de membrana CIC formen blocs amb els gens de la família FAM131 i de receptors d'efrina EPH. En canvi, els transportadors CIC no presenten aquests blocs (dades no mostrades). Això podria significar que la proteïna CIC més primitiva va donar lloc a aquests dos subtipus i que aquests han evolucionat independentment un de l'altre.

### **Transgènesi en el peix zebra: proteïnes humanes vs peix zebra**

En aquesta tesi s'han desenvolupat les eines necessàries per realitzar experiments de transgènesi en el múscul esquelètic del peix zebra. Per aquesta raó es va decidir utilitzar el promotor *unc503* gràcies a la forta expressió de proteïnes reporteres des dels primers estadis de desenvolupament (Berger i Currie, 2013).

Algunes proteïnes de membrana, com la rodopsina, no permeten la fusió de proteïnes fluorescents a l'extrem C-terminal, sinó que s'ha de generar una proteïna que incorpori la GFP dins la seqüència del C-terminal (Tam et al, 2000; Concepcion et al, 2002; Moritz et al, 2001). En el cas de les proteïnes LRRC8, components essencials de l'activitat VRAC, resultant en canals constitutivament oberts resultant en un increment en les seves corrents i en la taxa de transport d'osmòlits al fusionar proteïnes fluorescents al C-terminal (Gaitán-Peñas et al, 2016). D'altra banda, la fusió de GFP en la proteïna CIC-2 no sembla que alteri ni la seva localització ni propietats electrofisiològiques en línies cel·lulars (Jeworutzki et al, 2012). També, en l'article de Cheng et al. aconseguen generar línies estables que expressen el canal CIC-1 humà fusionat a GFP (Cheng et al, 2014) No obstant, la fusió de EGFP a l'extrem C-terminal de les proteïnes *clc-1* del peix zebra sí que altera el comportament de les proteïnes *clc-1*. En línies cel·lulars s'ha observat una reducció dels seus nivells, especialment en el cas de *clc-1b* el qual no s'expressa gens. Donada la importància del C-terminal en l'estabilitat i funció dels canals CIC, és possible que d'alguna manera la fusió de la proteïna GFP estigui interferint en algún tipus de senyalització, donant encara més rellevància a aquesta regió i probablement sigui la raó per la qual no aconseguim realitzar amb èxit els experiments de transgènesi. En canvi, la fusió amb un *tag* més petit com el FLAG sí que permet la seva expressió en línies cel·lulars. En un futur s'hauria de plantejar la possibilitat de testar l'expressió de les proteïnes *clc-1* amb la fusió de GFP a l'extrem N-terminal o fusionant *tags* petit a l'extrem C-terminal.

En canvi, amb la proteïna humana sí que hem estat capaços de generar transgènics. La fusió de CIC-1 amb RFP a l'extrem C-terminal es localitza correctament al sarcolema i als túbuls T. A més, la fusió de GFP a l'extrem N-terminal de CIC-1 també s'expressa i es localitza correctament al sarcolema i presenta les característiques funcionals pròpies de CIC-1 en miotubs de ratolí (Lueck et al, 2010).

### **Generació de models de pèrdua de funció: *morpholino* vs edició genòmica**

L'ús dels *morpholino* ha estat molt important per elucidar el paper de nombrosos gens (Nasevicius i Ekker, 2000; McWhorter et al, 2003; Boon et al, 2009). Aquí hem demostrat que som capaços d'alterar el procés d'*splicing* dels gens *clcn1a* i *clcn1b* mitjançant l'aplicació dels *morpholinos*. A més, s'observa com a mesura que s'incrementa la dosi administrada, també n'incrementa el seu efecte, però també la seva toxicitat. En el cas del *clcn1a<sup>mo</sup>*, l'administració de 2 ng genera l'aparició de dos fragments més grans que clarament presenten alteracions d'*splicing*, un incorpora part de l'intró 5 i el fragment més gran incorpora l'intró 5 sencer, mentre que la intensitat del fragment *wild-type* es veu disminuïda. Aquest efecte s'accentua amb l'administració de 4 i 8 ng de *morpholino* provocant l'aparició de només el fragment més gran i reduint encara més els nivells de mRNA *wild-type*. En el cas del *clcn1b<sup>mo</sup>*, tot i que també genera un fragment aberrant en el qual es perd part de l'exó 4, és poc eficient. L'administració de 8 ng gairebé no altera els nivells del fragment *wild-type*, sent doncs poc útil per estudiar efectes de pèrdua de funció. Tant l'addició de l'intró 5 (o només una part) en el gen *clcn1a* com la pèrdua de part de l'exó 4 en el gen *clcn1b*, provoquen un canvi en la pauta de lectura i l'aparició d'un codó *stop*. En la miotonia congènita, la patologia apareix quan només hi ha un 30% de l'activitat de CIC-1 (Meyer-Kleine et al, 1995) i amb l'ús dels *morpholinos*, que no arribem a eliminar cap dels dos gens completament, és improbable que es manifesti un fenotip degut a la pèrdua del canal. A més, si s'observa algun fenotip podria ser degut a efectes *off-target* que causen toxicitat, arribant a activar inespecíficament p53 a altes dosis (Ekker i Larson, 2001; Robu et al, 2007), generació de respostes mediades per interferó, activació dels receptors *toll-like*, saturació de la maquinària de RNA d'interferència (Anon, 2006) o en canvis en l'expressió gènica (Amoyel et al, 2005; Gerety i Wilkinson, 2001). A més, s'ha descrit alguns fenotips deguts a l'efecte d'un *morpholino* que no sempre coincideixen amb l'observat en una línia mutant nul·la (Kok et al, 2015). En un treball en el que generen un mutant mitjançant TALEN contra el gen *efl7*, una proteïna de la matriu extracel·lular, comparen el fenotip amb el del *morpholino* i veuen com aquest últim és molt més sever (Rossi et al, 2015). Realitzant un estudi transcriptòmic i proteòmic, descobreixen que en el mutant i no en el *morpholino*, diversos gens de la

matriu extracel·lular estan sobreexpressats i, per tant, compensant parcialment la pèrdua de *eff7*. De la mateixa manera, els mateixos autors troben el mateix fenomen pel gen *vegfaa*: el gen *vegfab* es troba sobreexpressat en el mutant per *vegfaa* però no en el morpholino (Rossi et al, 2015). Altres exemples inclouen els *morpholinos* contra *fnrl3* i *pdgfrb*, els quals bloquejen l'expansió dels vasos intersegmentals del tronc (Hetheridge et al, 2012; Wiens et al, 2010). En canvi, els mutants per aquests dos gens presenten un creixement dels vasos normal, indistingible d'animals *wild-type* (Kok et al, 2015).

Una de les grans limitacions de l'ús dels *morpholino* és la finestra de temps en la qual permet treballar. Es poden observar els seus efectes fins als 4 dpf com molt tard degut a la seva degradació i/o dilució (Ekker i Larson, 2001; Robu et al, 2007) i com s'ha esmentat prèviament, l'activitat motora és més fàcil d'estudiar als 6 dpf (Padilla et al, 2011). Per aquesta raó, l'ús de tècniques d'edició genòmica, tant aleatòria com dirigida, han estat útils per la generació i establiment de diferents línies mutants i realitzar els estudis en l'estadi de desenvolupament desitjat i fins i tot, en animals adults.

L'ús d'agents mutàgens com l'ENU han permès identificar gens implicats en diferents processos de desenvolupament embrionari gràcies a fenotips clarament visibles i caracteritzats (Amsterdam i Hopkins, 2006; Patton i Zon, 2001) com gens essencials per la gastrulació (Hammerschmidt et al, 1996), pel correcte desenvolupament cardíac (Stainier et al, 1996) o l'hematopoiesi (Ransom et al, 1996). No obstant, la mutagènesi aleatòria presenta diversos inconvenients: la clonació posicional dels gens causants dels fenotips és costosa i laboriosa, les mutacions es generen en heterozigosi de manera que els fenotips recessius queden enmascarats i no es detecten i, finalment, és pràcticament impossible inactivar cada gen en un genoma de manera aleatòria.

El desenvolupament d'eines d'edició genòmica dirigida, les *zinc-fingers*, les TALEN i finalment el CRISPR/Cas9 han permès solventar els inconvenients que presentaven les tècniques esmentades anteriorment i fer que el peix zebra sigui un bon model no només en el camp de la biologia del desenvolupament sinó que també per resoldre qüestions genètiques, assajos de toxicologia i cerca de fàrmacs. També han permès la ràpida generació de models per trastorns genètics i processos patològics, des de trastorns hematològics, neurològics i tumors (Lieschke i Currie, 2007; Ablain i Zon, 2013; Kalueff et al, 2014). Especialment, la facilitat de customitzar els dominis d'unió del DNA en el CRISPR, li confereix una gran avantatge respecte les altres dues

tècniques, a més de presentar una taxa d'*off-targets* inferior, sent nul·la en la major part dels casos (Hruscha et al, 2013; Veres et al, 2014). En les nostres mans, les TALEN han estat un 33% eficients (s'ha aconseguit generar mutants només en un sol gen dels 3 en els quals s'ha provat), mentre que el sistema CRISPR/Cas9 ha estat 100% eficaç, generant mutacions en els 3 gens testats i presentats en aquesta tesi.

Per validar i confirmar que un al·lel és nul i per tant evaluar la funció d'un gen, cada cop més i especialment des de l'aparició dels CRISPR, és necessari obtenir i examinar diferents al·lells per un mateix gen, ja que en alguns casos s'han observat discrepàncies entre diferents mutants. Tal és el cas pel gen *TBX5*. El gen *TBX5* codifica per un factor de transcripció amb el mateix nom clau pel desenvolupament del cor i de les extremitats superiors durant l'etapa embrionària en vertebrats (Rallis, 2003). Mutacions en aquest gen donen lloc a un trastorn de desenvolupament en humans, la síndrome de Holt Oram, caracteritzada per defectes congènits en la formació del cor i de les extremitats superiors (Basson et al, 1997; Li et al, 1997). En un *screening* de mutagènesi induïda per ENU, es va identificar que l'al·lel *hst<sup>m21</sup>* presentava una mutació puntual en el gen *tbx5a*, ortòleg de *TBX5* (Garrity et al, 2002). Aquest mutant i el *morpholino* contra *tbx5a* presenten absència total de les aletes pectorals i diversos defectes cardíacs, entre ells, l'elongació del tub cardíac (Ahn et al, 2002; Garrity et al, 2002). Recentment, un grup ha generat dos al·lells mutants amb CRISPR, una deleció de 5 nucleòtids i una altre de 10 nucleòtids, anomenades  $\Delta 5$  i  $\Delta 10$ , respectivament (Chiavacci et al, 2017). Amdós al·lells generen canvis en la pauta de lectura i l'aparició d'un codó *stop* prematur. El *incross* de cada línia i el trans-heterozigot (fruit de creuar animals  $\Delta 5$  amb  $\Delta 10$ ) també presenten la pèrdua total de les aletes pectorals i defectes cardíacs. No obstant, mai detecten el fenotip més sever (Chiavacci et al, 2017). Els autors plantegen la possibilitat de que els al·lells generats amb CRISPR no siguin nuls. Una altra possibilitat que suggereixen és que tant l'al·lel *hst* com els *morpholinos* presentin un fenotip hipomòrfic o presentin un efecte dominant negatiu degut a nivells residuals de proteïna truncada o baixes concentracions de proteïna, respectivament. Per aquesta raó en aquesta tesi s'estan estudiant dos al·lells pel gen *clcn1a* generats amb CRISPR i dos al·lells més pel gen *clcn1b*, un obtingut per mutagènesi induïda per ENU i l'altre amb CRISPR. D'aquesta manera pretenem aconseguir uns resultats robustos i estar segurs que els fenotips observats són deguts a la pèrdua completa dels gens d'estudi. Serà interessant realitzar els estudis de comportament en el mutant de *clcn1b* generat per CRISPR i comparar-los amb els de la línia *clcn1b<sup>sa13816</sup>* i comprovar si hi ha diferències entre el mutant puntual i el mutant que presenta la deleció. A més, a diferència dels autors

d'aquest article (Chiavacci et al, 2017) que plantegen la possibilitat de que els seus al·lels siguin hipomòrfics, disposem d'anticossos per tal de validar que els al·lels generats siguin nuls.

### **Avaluació del comportament motor**

La miotonia congènita apareix durant la infància, moment en què es manifesta la rigidesa muscular degut a un defecte en la relaxació d'aquests. Per aquesta raó, vam decidir analitzar el comportament de les línies mutants en estadis larvaris. A més, aquests estadis més primerencs de desenvolupament, permeten la realització d'estudis de prova de compostos a gran escala i gràcies a la seva transparència, detectar possibles efectes adversos que afectin al desenvolupament degut a toxicitat.

Cheng et al. utilitzen una altra aproximació diferent a la que hem aplicat nosaltres per tal d'assolir el mateix objectiu, aconseguir que el peix zebra manifesti alteracions motores reminiscent a la miotonia congènita (Cheng et al, 2014). No obstant, els autors presenten el model en forma adulta. Enlloc de l'estratègia clàssica de disruptir els canals endògens, han generat línies transgèniques estables que expressen el canal Clc-1 humà WT o diferents mutacions identificades en pacients (L884F i la mutació composta I553F/H555N) amb efectes dominants que resulten en el canvi de la dependència de voltatge d'activació del canal (Burgunder et al, 2008). Les línies amb les mutacions presenten un menor angle de curvatura del cos durant la natació. Aquest fet, que els autors suggereixen que és degut a debilitat muscular, resulta en una menor distància recorreguda (Cheng et al, 2014).

D'altre banda, els resultats de Cheng et al. suggereixen de manera indirecta que el canal Clc-1 amb les mutacions de pacients, exerceix un efecte dominant negatiu sobre els canals endògens del peix zebra donant lloc a aquest fenotip motor. Aquest fet recolza la idea de que una línia *knock out* doble, la qual estem generant, doni lloc a un peix amb miotonia degut a la pèrdua simultània de les proteïnes clc-1a i clc-1b.

Els embrions de peix zebra comencen a desenvolupar un comportament motor a partir de les 17 hpf, on comencen a aparèixer contraccions espontànies de la cua. A partir de les 21 hpf, responen al tacte al cap o a la cua en forma de torcions i a les 27 hpf presenten una resposta d'escapada nadant en resposta al tacte, especialment a la cua. Aquestes torcions incrementen en velocitat i nombre de vegades fins les 48 hpf, moment proper a la sortida de l'ou (Amant i Drapeau, 1998). En aquest mateix treball demostren com és possible estudiar el comportament motor, ja sigui espontani o amb

estímuls, en larves de peix zebra. Immobilitzant les larves en agarosa, deixant lliure el tronc i la cua, i amb l'ajuda d'una càmera és possible registrar el moviment dels embrions i quantificar-ne diversos paràmetres, com l'angle de torció. Aquests estudis són robustos i reproduïbles, de manera que és possible estudiar com mutacions o lesions tissulars afecten al comportament motor. En el treball de Naganawa i Hirata, 2011 mesuren l'angle entre la cua i el cap durant una torció en larves immobilitzades i observen com a les 48 hpf les larves mutants pel gen *flii*, que codifica per una proteïna reguladora d'actina, presenten un angle més petit, demostrant afectació contràctil. Més recentment s'han desenvolupat aparells comercials que faciliten la realització i el posterior anàlisi d'aquests estudis de comportament motor, permetent l'anàlisi des de 24 a 96 larves alhora amb la possibilitat d'aplicar estímuls lluminosos o de vibració (ViewPoint).

Tot i el gran nombre de publicacions que realitzen estudis de comportament en el peix zebra, sorprèn la manca de detalls en la metodologia aplicada tenint en compte el gran nombre de factors que poden influir en els resultats dels experiments (Padilla et al, 2011). En aquest treball analitzen diversos factors dels quals alguns són intrínscics dels animals d'estudi, com l'edat, i altres que són ambientals com la presència/absència i la intensitat de la llum i l'espai que disposen per desplaçar-se. Un altre factor important a considerar és la soca de peix zebra utilitzada. S'ha descrit que dues de les soques més utilitzades, AB i TL, presenten diferències no només a nivell morfològic, genètic o fisiològic, sinó també en quant a comportament (Gorissen et al, 2015; Séguret et al, 2016). La soca AB s'habitua més ràpidament als estímuls acústics i manifesten una resposta més elevada davant canvis de períodes de llum i fosc (van den Bos et al, 2017).

En condicions de llum, les larves a 4 dpf mostren una activitat molt baixa i aquesta presenta un petit increment als 5 dpf. En canvi, als 6 dpf les larves arriben a recórrer fins a 4 vegades més distància. Per tant, l'estudi en estadis més tardans ofereixen més resolució fent possible l'estudi del comportament de mutants que, en el cas de la miotonia, hipotetitzem que presentaran una activitat motora reduïda. D'altre banda, el nivell d'activitat en aquests tres estadis passen a ser molt similars quan les larves són sotmeses a un període de fosc, després d'haver estat amb llum (Padilla et al, 2011). De la mateixa manera, quan l'experiment es realitza en plaques amb pous més grans, com plaques de 24 pous, la distància recorreguda també és molt més elevada comparada amb altres suports de menor diàmetre. En consonància amb aquests resultats, també hem observat una major activitat als 7 dpf i, per aquestes raons, els

estudis de comportament s'han realitzat en aquest estadi. A més, s'ha fixat una intensitat de llum del 8% i l'ús de plaques de 24 pous. Els estudis de comportament en aquestes condicions ens han permès fer una primera caracterització de la pèrdua dels gens *clcn1a* i *clcn1b* per separat. A 7 dpf, els mutants pels dos canals presenten una activitat motora espontània indistingible de la dels animals *wild-type*. Aquest resultat és plausible amb els pacients de Miotonia, els quals poden realitzar moviments no intensos.

A més de l'activitat espontània, és interessant l'aplicació d'estímuls que incrementin l'activitat basal de les larves. Habitualment s'utilitzen períodes de llum i foscor o estímuls acústics (Burgess i Granato, 2007; Zeddies i Fay, 2005). Tots dos mètodes generen una resposta d'escapada amb característiques diferents. Les respostes induïdes per la llum són més llargues que les provocades per estímuls acústics i en aquests, la velocitat angular durant la torsió també és més elevada (Burgess i Granato, 2007). S'ha descrit que les larves de peix zebra presenten respostes d'escapada a estímuls acústics a partir dels 5 dpf, moment en què les estructures que formen part del sistema auditiu s'han format, com la calcificació dels otolits, i quan la bufeta natatòria s'ha inflat (Kimmel et al, 1974; Eaton i DiDomenico, 1986). Així doncs, amb la idea de forçar l'activitat motora i comprovar si les línies mutants generades presenten alteracions motores, es van aplicar diferents protocols d'estímuls de vibració. Al realitzar aquests experiments tampoc s'observa cap diferència en els animals mutants. Una primera explicació seria que, en humans, el fenotip es manifesta quan s'ha perdut almenys un 30% de l'activitat de CIC-1 (Meyer-Kleine et al, 1995) i en les línies mutants estudiades només s'ha eliminat el 50% de l'activitat *clc-1* en cadascuna. Malgrat aquests resultats, podem afirmar que els estímuls són efectius ja que es genera un increment en la distància recorreguda. A més, en el protocol que consisteix en estímuls d'un segon s'observa com en l'últim el pic d'increment de la distància recorreguda és menor respecte als estímuls anteriors, mentre que en el protocol on l'estímul té una durada de dos segons, no s'observa aquest efecte. S'ha trobat que depenent de la intensitat de l'estímul i la separació temporal entre aquests, és possible que es doni un fenomen d'habitució en el qual les larves redueixen el grau de resposta (Zeddies i Fay, 2005). En aquesta publicació, els autors estableixen intervals d'uns 100 segons entre estímuls i no observen cap senyal d'habitució. En els nostres experiments, els intervals són només de 5 segons perquè l'objectiu és forçar les larves a generar moviments d'escapada successius per tal d'evaluar un possible defecte en la relaxació muscular. Només hem realitzat un total de 5 estímuls per experiment, mentre que en l'article els autors n'apliquen un total de 75. És possible que al aplicar-

ne tant pocs les larves no arribin a habitar-se. Una altre qüestió a tenir en compte és la freqüència dels estímuls acústics. Mentre que el peix zebra presenta un rang auditiu d'entre 100 i 4000 Hz (Higgs et al, 2002) i, per tant, s'hauria de treballar dins d'aquest marge, nosaltres hem aplicat estímuls de 50 Hz i també hem observat activitat. En un futur potser es podrien repetir els experiments realitzats aplicant estímuls amb freqüències més altes i comparar-ne els resultats.

A més, l'estudi detallat dels diferents tipus de moviments que presenten les larves de peix zebra, ja sigui de manera espontània o sota estímuls, ofereixen la possibilitat d'analitzar a gran escala els possibles efectes tòxics o terapèutics de diferents fàrmacs. Per exemple, l'administració d'apomorfina i amfetamina en larves de 10 dpf resulta en una disminució en el nombre de vegades que es mouen en un període de temps determinat, mostrant així efectes similars als observats amb rates (Ek et al, 2016; Palmér et al, 2017). Aquest fet suggereix que els mecanismes implicats en el comportament motor del peix zebra presenta característiques similars a la dels mamífers, de manera que podria ser un model translacional alternatiu a la rata o el ratolí. En el camp dels trastorns musculars, l'estudi del mutant *relatively relaxed*, que presenta una inserció intrònica en el gen *ryr1b* (ortòleg al gen *RYR1* en humans) provocant l'aparició prematura d'un codó *stop*, ha permès identificar defectes tant en el moviment espontani com en la resposta d'escapada induïda per tacte a la cua. Aquests mutants responen als estímuls però molt lentament i la distància recorreguda també és menor (Hirata et al, 2007). El mutant Tg(ACTA1<sup>D286G</sup>-eGFP), utilitzat com a model per la miopatia nemalínica que es caracteritza per una important debilitat muscular, presenta una acceleració significativament menor quan inicia un moviment d'escapada evocat per tacte (Sztal et al, 2016). Aquest fet indica que la funció muscular està compromesa de manera similar a la descrita en models de ratolí i en pacients (Ravenscroft et al, 2011a; Ravenscroft et al, 2011b). Tot i que aquests models són de distròfies musculars, clínicament molt més severes que no pas la miotonia congènita, hi ha prou evidències per pensar que els estudis de comportament motor poden ser una eina útil per l'estudi de la manca de *clcn1*.

### **Funcions redundants de *clcn1a* i *clcn1b***

La pèrdua de només un dels dos gens *clcn1* no provoca cap fenotip motor aparent en les larves de peix zebra a 7 dpf, de manera que l'activitat del canal intacte seria suficient per compensar la manca de l'altre canal i donat que s'expressen en el mateix teixit, és probable que presentin funcions redundants, fenomen que s'ha descrit prèviament en llevat (Cohen et al, 1987), *Drosophila* (Cadigan et al, 1994) i ratolí



(Wang et al, 1996). En peix zebra, s'ha observat que diverses proteïnes de la matriu extracel·lular es troben sobreexpressades en animals *knock out* de *egfl7*, un component de la matriu, i no presenta cap fenotip probablement degut a la compensació pels canvis en l'expressió d'altres gens (Rossi et al, 2015). Tanmateix, l'animal deficient per *vegfaa*, manifesta una sobreexpressió del seu paràleg *vegfab* (Rossi et al, 2015). En un altre estudi de paràlegs en peix zebra, en el que generen línies mutants senzilles i una doble pels gens *prps1a* i *prps1b*, observen com el mutant *prps1a*<sup>-/-</sup> presenta uns ulls més petits i pigmentació reduïda en la retina. A nivell histològic, observen com en la retina presenten un retard en el seu desenvolupament i en la formació de les diferents capes d'aquesta. En canvi, els animals *prps1b*<sup>-/-</sup> no presenten cap fenotip aparent. Sorprenentment, els animals *prps1a*<sup>-/-</sup> *prps1b*<sup>-/-</sup> presenten un fenotip molt més sever de desenvolupament i desorganització de les diferents capes de la retina. Aquests resultats suggereixen que el gen *prps1a* és el paràleg dominant, mentre que el gen *prps1b* presenta un paper de suport, addicional, el qual és suficient per assegurar la supervivència de l'individu en cas d'absència de *prps1a* (Pei et al, 2016). En el cas dels *clcn1*, no s'observa sobreexpressió de *clcn1b* en els mutants de *clcn1a* ni viceversa, suggerint que probablement no sigui necessari un mecanisme de compensació gènica donat que amb una sola còpia ja sigui suficient per generar una conductància de clorur en les fibres musculars per la repolarització d'aquestes i mantenir el potencial de repòs estable.

# **CONCLUSIONS**



1. La inspecció del genoma del peix zebra ha revelat la presència de dos gens ortòlegs per a *CLCN1*, tres per *CLCN2* i només un per *CLCNKA/B*. Presenta dos ortòlegs per *GLIALCAM* i un per *BSND*. S'han clonat tots aquests gens i s'ha determinat la seva expressió tissular per qPCR i hibridació *in situ*. A més, s'han desenvolupat anticossos policlonals per la detecció de totes aquestes proteïnes.
2. L'anàlisi dels gens *clcn2* del peix zebra revelen que *clcn2a* i *clcn2b* són resultat de la duplicació genòmica dels teleostis amb funcions probablement equivalents a CIC-2 de mamífers mentre que *clcn2c* ha sorgit degut a una duplicació gènica independent que ha resultat en un gen específic de peixos.
3. La capacitat d'interacció amb la subunitat accessòria GlialCAM de les proteïnes clc-2 està conservada ja que es modifica la localització cel·lular i la funció de clc-2a i clc-2b en presència de GlialCAM. Tanmateix, Barttin estabilitza i modifica la localització cel·lular de clc-k.
4. La tècnica CRISPR/Cas i TILLING han permès la generació de peix zebra amb mutacions probablement deletèries en *clcn1a* i *clcn1b*. L'anàlisi d'aquests models mostren que la pèrdua de funció dels gens *clcn1a* i *clcn1b* no afecten al moviment espontani de les larves ni a l'increment d'activitat després dels estímuls de vibració. Probablement es tractin de gens amb funció redundant i per això l'anàlisi del doble mutant serà clau per comprovar si la manca total d'activitat clc-1 provoca un fenotip que ressembli la miotonia congènita.



# **BIBLIOGRAFIA**



- Accardi, A. and Miller, C.** (2004). Secondary active transport mediated by a prokaryotic homologue of ClC Cl<sup>-</sup> channels. *Nature* **427**, 803–807.
- Accardi, A., Kolmakova-Partensky, L., Williams, C. and Miller, C.** (2004). Ionic currents mediated by a prokaryotic homologue of CLC Cl<sup>-</sup> channels. *J. Gen. Physiol.* **123**, 109–19.
- Accardi, A., Walden, M., Nguitrugool, W., Jayaram, H., Williams, C. and Miller, C.** (2005). Separate ion pathways in a Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *J. Gen. Physiol.* **126**, 563–70.
- Adrian, R. H. and Bryant, S. H.** (1974). On the repetitive discharge in myotonic muscle fibres. *J. Physiol.* **240**, 505–15.
- Ahmed, N., Ramjeesingh, M., Wong, S., Varga, A., Garami, E. and Bear, C. E.** (2000). Chloride channel activity of ClC-2 is modified by the actin cytoskeleton. *Biochem. J.* **352 Pt 3**, 789–94.
- Aichele, R., Paik, H. and Heller, A. H.** (1985). Efficacy of phenytoin, procainamide, and tocainide in murine genetic myotonia. *Exp. Neurol.* **87**, 377–81.
- Akizuki, N., Uchida, S., Sasaki, S. and Marumo, F.** (2001). Impaired solute accumulation in inner medulla of *Clcnk1*<sup>-/-</sup> mice kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **280**, F79-87.
- Amiry-Moghaddam, M., Williamson, A., Palomba, M., Eid, T., de Lanerolle, N. C., Nagelhus, E. A., Adams, M. E., Froehner, S. C., Agre, P. and Ottersen, O. P.** (2003). Delayed K<sup>+</sup> clearance associated with aquaporin-4 mislocalization: phenotypic defects in brains of alpha-syntrophin-null mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 13615–20.
- Amores, A., Force, A., Yan, Y.-L., Joly, L., Amemiya, C., Fritz, A., Ho, R. K., Langeland, J., Prince, V., Wang, Y.-L., et al.** (1998). Zebrafish hox Clusters and Vertebrate Genome Evolution. *Science (80- )*. **282**,.
- Amsterdam, A. and Hopkins, N.** (2006). Mutagenesis strategies in zebrafish for identifying genes involved in development and disease. *Trends Genet.* **22**, 473–478.
- Arreola, J., Begenisich, T. and Melvin, J. E.** (2002). Conformation-dependent regulation of inward rectifier chloride channel gating by extracellular protons. *J. Physiol.* **541**, 103–12.
- Bali, M., Lipecka, J., Edelman, A. and Fritsch, J.** (2001). Regulation of ClC-2 chloride channels in T84 cells by TGF- $\alpha$ . *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **280**,.
- Baraban, S. C., Dinday, M. T. and Hortopan, G. A.** (2013). Drug screening in *Scn1a* zebrafish mutant identifies clemizole as a potential Dravet syndrome treatment.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A. and Horvath, P.** (2007). CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science (80- )*. **315**, 1709–1712.
- Bassett, D. I. and Currie, P. D.** (2003). The zebrafish as a model for muscular dystrophy and congenital myopathy. *Hum. Mol. Genet.* **12 Spec No**, R265–R270.
- Bassett, A. R., Tibbit, C., Ponting, C. P. and Liu, J.-L.** (2013). Highly Efficient Targeted Mutagenesis of *Drosophila* with the CRISPR/Cas9 System. *Cell Rep.* **4**, 220–228.
- Bedell, V. M., Wang, Y., Campbell, J. M., Poshusta, T. L., Starker, C. G., Krug, R. G., Tan, W., Penheiter, S. G., Ma, A. C., Leung, A. Y. H., et al.** (2012). *In vivo* genome editing using a high-efficiency TALEN system. *Nature* **491**, 114–8.



- Benfenati, V. and Ferroni, S.** (2010). Water transport between CNS compartments: functional and molecular interactions between aquaporins and ion channels. *Neuroscience* **168**, 926–940.
- Bennetts, B. and Parker, M. W.** (2013). Molecular determinants of common gating of a Cl<sup>-</sup> chloride channel. *Nat. Commun.* **4**, 2507.
- Bennetts, B., Parker, M. W. and Cromer, B. A.** (2007). Inhibition of skeletal muscle Cl<sup>-</sup> chloride channels by low intracellular pH and ATP. *J. Biol. Chem.* **282**, 32780–91.
- Bennetts, B., Yu, Y., Chen, T.-Y. and Parker, M. W.** (2012). Intracellular  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide inhibits the skeletal muscle Cl<sup>-</sup> chloride channel. *J. Biol. Chem.* **287**, 25808–20.
- Berchtold, M. W., Brinkmeier, H. and Mu, M.** (2000). Calcium Ion in Skeletal Muscle : Its Crucial Role for Muscle Function, Plasticity, and Disease. *Physiol. Rev.* **80**, 1215–1265.
- Berg, J. M.** (1988). Proposed structure for the zinc-binding domains from transcription factor IIIA and related proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 99–102.
- Berger, J. and Currie, P. D.** (2013). *503unc*, a small and muscle-specific zebrafish promoter. *genesis* **51**, 443–447.
- Berger, J., Berger, S., Hall, T. E., Lieschke, G. J. and Currie, P. D.** (2010). Dystrophin-deficient zebrafish feature aspects of the Duchenne muscular dystrophy pathology. *Neuromuscul. Disord.* **20**, 826–832.
- Bernard, P. and Couturier, M.** (1992). Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J. Mol. Biol.* **226**, 735–745.
- Bibikova, M., Golic, M., Golic, K. G. and Carroll, D.** (2002). Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics* **161**, 1169–75.
- Bibikova, M., Beumer, K., Trautman, J. K. and Carroll, D.** (2003). Enhancing Gene Targeting with Designed Zinc Finger Nucleases. *Science (80- )*. **300**, 764–764.
- Birkenhäger, R., Otto, E., Schürmann, M. J., Vollmer, M., Ruf, E.-M., Maier-Lutz, I., Beekmann, F., Fekete, A., Omran, H., Feldmann, D., et al.** (2001). Mutation of *BSND* causes Bartter syndrome with sensorineural deafness and kidney failure. *Nat. Genet.* **29**, 310–314.
- Blanz, J., Schweizer, M., Auberson, M., Maier, H., Muenscher, A., Hübner, C. A. and Jentsch, T. J.** (2007). Leukoencephalopathy upon Disruption of the Chloride Channel Cl<sup>-</sup>2. *J. Neurosci.* **27**,.
- Blijham, P. J., Hengstman, G. J. D., Ter Laak, H. J., Van Engelen, B. G. M. and Zwarts, M. J.** (2004). Muscle-fiber conduction velocity and electromyography as diagnostic tools in patients with suspected inflammatory myopathy: A prospective study. *Muscle Nerve* **29**, 46–50.
- Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A. and Ehrlich, S. D.** (2005). Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* **151**, 2551–2561.
- Bonifacino, J. S. and Traub, L. M.** (2003). Signals for sorting of transmembrane proteins to

- endosomes and lysosomes. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 395–447.
- Boon, K.-L., Xiao, S., McWhorter, M. L., Donn, T., Wolf-Saxon, E., Bohnsack, M. T., Moens, C. B. and Beattie, C. E.** (2009). Zebrafish survival motor neuron mutants exhibit presynaptic neuromuscular junction defects. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 3615–3625.
- Boron, Walter F. Boulpaep, Emile L.** (Eds.) *Medical physiology: a cellular and molecular approach*. Philadelphia, PA : Saunders/Elsevier (2009).
- Bösl, M. R., Stein, V., Hübner, C., Zdebik, A. A., Jordt, S. E., Mukhopadhyay, A. K., Davidoff, M. S., Holstein, A. F. and Jentsch, T. J.** (2001). Male germ cells and photoreceptors, both dependent on close cell-cell interactions, degenerate upon CIC-2 Cl<sup>-</sup> channel disruption. *EMBO J.* **20**, 1289–99.
- Bossus, M., Charmantier, G., Blondeau-Bidet, E., Valletta, B., Boulo, V. and Lorin-Nebel, C.** (2013). The CIC-3 chloride channel and osmoregulation in the European Sea Bass, *Dicentrarchus labrax*. *J. Comp. Physiol. B* **183**, 641–662.
- Boyett, M. R., Honjo, H. and Kodama, I.** (2000). The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure. *Cardiovasc. Res.* **47**, 658–87.
- Bradberry, S. M., Watt, B. E., Proudfoot, A. T. and Vale, J. A.** (2000). Mechanisms of toxicity, clinical features, and management of acute chlorophenoxy herbicide poisoning: a review. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* **38**, 111–22.
- Branicky, R., Miyazaki, H., Strange, K. and Schafer, W. R.** (2014). The voltage-gated anion channels encoded by *clh-3* regulate egg laying in *C. elegans* by modulating motor neuron excitability. *J. Neurosci.* **34**, 764–75.
- Bretag, A. H.** (1987). Muscle chloride channels. *Physiol. Rev.* **67**,.
- Brodsky, M. A., Chun, J. G., Podrid, P. J., Douban, S., Allen, B. J. and Cygan, R.** (1996). Regional Attitudes of Generalists, Specialists, and Subspecialists About Management of Atrial Fibrillation. *Arch. Intern. Med.* **156**, 2553.
- Brossi, A., Uskoković, M., Gutzwiller, J., Krettli, A. U. and Brener, Z.** (1971). Antimalarial activity of natural, racemic and unnatural dihydroquinine, dihydroquinidine and their various racemic analogs in mice infected with *Plasmodium berghei*. *Experientia* **27**, 1100–1.
- Brown, R. D. and Feldman, A. M.** (1978). Pharmacology of Hearing and Ototoxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **18**, 233–252.
- Bryant, S. H. and Morales-Aguilera, A.** (1971). Chloride conductance in normal and myotonic muscle fibres and the action of monocarboxylic aromatic acids. *J. Physiol.* **219**, 367–83.
- Bulfield, G., Siller, W. G., Wight, P. A. and Moore, K. J.** (1984). X chromosome-linked muscular dystrophy (*mdx*) in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 1189–92.
- Burger, A., Lindsay, H., Felker, A., Hess, C., Anders, C., Chiavacci, E., Zaugg, J., Weber, L. M., Catena, R., Jinek, M., et al.** (2016). Maximizing mutagenesis with solubilized CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Development* **143**, 2025–2037.
- Burgess, H. A. and Granato, M.** (2007). Modulation of locomotor activity in larval zebrafish during light adaptation. *J. Exp. Biol.* **210**,.

- Burgunder, J.-M., Huifang, S., Beguin, P., Baur, R., Eng, C. S., Seet, R. C. S., Lim, E. C. H., Ong, B. K. C., Hunziker, W. and Sigel, E.** (2008). Novel chloride channel mutations leading to mild myotonia among Chinese. *Neuromuscul. Disord.* **18**, 633–40.
- Butt, A. M. and Kalsi, A.** (2006). Inwardly rectifying potassium channels ( $K_{ir}$ ) in central nervous system glia: a special role for  $K_{ir4.1}$  in glial functions. *J. Cell. Mol. Med.* **10**, 33–44.
- Cadigan, K. M., Grossniklaus, U. and Gehring, W. J.** (1994). Functional redundancy: the respective roles of the two sloppy paired genes in *Drosophila* segmentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 6324–8.
- Camacho Vanegas, O., Bertini, E., Zhang, R.-Z., Petrini, S., Minosse, C., Sabatelli, P., Giusti, B., Chu, M.-L. and Pepe, G.** (2001). Ullrich scleroatonic muscular dystrophy is caused by recessive mutations in collagen type VI. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 7516–7521.
- Capdevila-Nortes, X., López-Hernández, T., Apaja, P. M., López de Heredia, M., Sirisi, S., Callejo, G., Arnedo, T., Nunes, V., Lukacs, G. L., Gasull, X., et al.** (2013). Insights into MLC pathogenesis: GlialCAM is an MLC1 chaperone required for proper activation of volume-regulated anion currents. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 4405–4416.
- Catalán, M. A., Flores, C. A., González-Begne, M., Zhang, Y., Sepúlveda, F. V and Melvin, J. E.** (2012). Severe defects in absorptive ion transport in distal colons of mice that lack CIC-2 channels. *Gastroenterology* **142**, 346–54.
- Catalano, A., Carocci, A., Corbo, F., Franchini, C., Muraglia, M., Scilimati, A., De Bellis, M., De Luca, A., Camerino, D. C., Sinicropi, M. S., et al.** (2008). Constrained analogues of tocainide as potent skeletal muscle sodium channel blockers towards the development of antimyotonic agents. *Eur. J. Med. Chem.* **43**, 2535–40.
- Cederholm, J. M., Rychkov, G. Y., Bagley, C. J. and Bretag, A. H.** (2010). Inter-subunit communication and fast gate integrity are important for common gating in hCIC-1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **42**, 1182–1188.
- Chandrasegaran, S. and Smith, J.** (1999). Chimeric Restriction Enzymes: What Is Next? *Biol. Chem.* **380**, 841–8.
- Chang, N., Sun, C., Gao, L., Zhu, D., Xu, X., Zhu, X., Xiong, J.-W. and Xi, J. J.** (2013). Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in Zebrafish embryos. *Cell Res.* **23**, 465–472.
- Charlet-B, N., Savkur, R. S., Singh, G., Phillips, A. V, Grice, E. A., Cooper, T. A., Roberts, R., Caskey, C. T., Swanson, M. S., Cros, D., et al.** (2002). Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. *Mol. Cell* **10**, 45–53.
- Chen, M. F. and Chen, T. Y.** (2001). Different fast-gate regulation by external  $Cl^-$  and  $H^+$  of the muscle-type CIC chloride channels. *J. Gen. Physiol.* **118**, 23–32.
- Chen, T. Y. and Miller, C.** (1996). Nonequilibrium gating and voltage dependence of the CIC-0  $Cl^-$  channel. *J. Gen. Physiol.* **108**, 237–50.
- Chen, T. T., Klassen, T. L., Goldman, A. M., Marini, C., Guerrini, R. and Noebels, J. L.** (2013). Novel brain expression of CIC-1 chloride channels and enrichment of *CLCN1*

- variants in epilepsy. *Neurology* **80**, 1078–85.
- Chen, Y.-A., Peng, Y.-J., Hu, M.-C., Huang, J.-J., Chien, Y.-C., Wu, J.-T., Chen, T.-Y. and Tang, C.-Y.** (2015). The Cullin 4A/B-DDB1-Cereblon E3 Ubiquitin Ligase Complex Mediates the Degradation of CLC-1 Chloride Channels. *Nat. Publ. Gr.* **5**, 10667.
- Cheng, W., Tian, J., Burgunder, J.-M., Hunziker, W. and Eng, H.-L.** (2014). Myotonia congenita-associated mutations in chloride channel-1 affect zebrafish body wave swimming kinematics. *PLoS One* **9**, e103445.
- Cheng, G., Kim, M., Jia, G. and Agrawal, D.** (2007). Involvement of chloride channels in IGF-I-induced proliferation of porcine arterial smooth muscle cells. *Cardiovasc. Res.* **73**, 198–207.
- Chever, O., Djukic, B., McCarthy, K. D. and Amzica, F.** (2010). Implication of  $K_{ir4.1}$  Channel in Excess Potassium Clearance: An In Vivo Study on Anesthetized Glial-Conditional  $K_{ir4.1}$  Knock-Out Mice. *J. Neurosci.* **30**,.
- Claes, L., Del-Favero, J., Ceulemans, B., Lagae, L., Van Broeckhoven, C. and De Jonghe, P.** (2001). *De novo* mutations in the sodium-channel gene *SCN1A* cause severe myoclonic epilepsy of infancy. *Am. J. Hum. Genet.* **68**, 1327–32.
- Claes, L., Ceulemans, B., Audenaert, D., Smets, K., Löfgren, A., Del-Favero, J., Ala-Mello, S., Basel-Vanagaite, L., Plecko, B., Raskin, S., et al.** (2003). *De novo* *SCN1A* mutations are a major cause of severe myoclonic epilepsy of infancy. *Hum. Mutat.* **21**, 615–621.
- Clark, S., Jordt, S. E., Jentsch, T. J. and Mathie, A.** (1998). Characterization of the hyperpolarization-activated chloride current in dissociated rat sympathetic neurons. *J. Physiol.* 665–78.
- Cohen, R., Yokoi, T., Holland, J. P., Pepper, A. E. and Holland, M. J.** (1987). Transcription of the constitutively expressed yeast enolase gene *ENO1* is mediated by positive and negative cis-acting regulatory sequences. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 2753–61.
- Colding-Jørgensen, E.** (2005). Phenotypic variability in myotonia congenita. *Muscle Nerve* **32**, 19–34.
- Concepcion, F., Mendez, A. and Chen, J.** (2002). The carboxyl-terminal domain is essential for rhodopsin transport in rod photoreceptors. *Vision Res.* **42**, 417–426.
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A., et al.** (2013). Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science (80-. )*. **339**, 819–823.
- Conte-Camerino, D., Tortorella, V., Ferranini, E. and Bryant, S. H.** (1984). The toxic effects of clofibrate and its metabolite on mammalian skeletal muscle: an electrophysiological study. *Arch. Toxicol. Suppl.* **7**, 482–4.
- Conte Camerino, D., De Luca, A., Mambrini, M. and Vrbová, G.** (1989). Membrane ionic conductances in normal and denervated skeletal muscle of the rat during development. *Pflugers Arch.* **413**, 568–70.
- Conte Camerino, D., Tricarico, D., Pierno, S., Desaphy, J.-F., Liantonio, A., Pusch, M., Burdi, R., Camerino, C., Fraysse, B. and De Luca, A.** (2004). Taurine and skeletal

- muscle disorders. *Neurochem. Res.* **29**, 135–42.
- Coombs, J. S., Eccles, J. C. and Fatt, P.** (1955). The specific ionic conductances and the ionic movements across the motoneuronal membrane that produce the inhibitory post-synaptic potential. *J. Physiol.* **130**, 326–74.
- Cooperman, S. S., Grubman, S. A., Barchi, R. L., Goodman, R. H. and Mandel, G.** (1987). Modulation of sodium-channel mRNA levels in rat skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 8721–5.
- Cornejo, I., Niemeyer, M. I., Zúñiga, L., Yusef, Y. R., Sepúlveda, F. V. and Cid, L. P.** (2009). Rapid recycling of CIC-2 chloride channels between plasma membrane and endosomes: Role of a tyrosine endocytosis motif in surface retrieval. *J. Cell. Physiol.* **221**, 650–657.
- Cortez, M. A., Li, C., Whitehead, S. N., Dhani, S. U., D’Antonio, C., Huan, L. J., Bennett, S. A. L., Snead, O. C. and Bear, C. E.** (2010). Disruption of CIC-2 expression is associated with progressive neurodegeneration in aging mice. *Neuroscience* **167**, 154–162.
- Cuppoletti, J., Tewari, K. P., Sherry, A. M., Kupert, E. Y. and Malinowska, D. H.** (2001). CIC-2 Cl<sup>-</sup> channels in human lung epithelia: activation by arachidonic acid, amidation, and acid-activated omeprazole. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **281**,.
- Cuppoletti, J., Tewari, K. P., Sherry, A. M., Ferrante, C. J. and Malinowska, D. H.** (2004). Sites of protein kinase A activation of the human CIC-2 Cl<sup>-</sup> channel. *J. Biol. Chem.* **279**, 21849–56.
- D’Agostino, D., Bertelli, M., Gallo, S., Cecchin, S., Albiero, E., Garofalo, P. G., Gambardella, A., St. Hilaire, J.-M., Kwiecinski, H., Andermann, E., et al.** (2004). Mutations and polymorphisms of the *CLCN2* gene in idiopathic epilepsy. *Neurology* **63**, 1500–1502.
- de Castro Ribeiro, M., Hirt, L., Bogousslavsky, J., Regli, L. and Badaut, J.** (2006). Time course of aquaporin expression after transient focal cerebral ischemia in mice. *J. Neurosci. Res.* **83**, 1231–1240.
- De Domenico, I., McVey Ward, D., Nemeth, E., Ganz, T., Corradini, E., Ferrara, F., Musci, G., Pietrangelo, A. and Kaplan, J.** (2006). Molecular and clinical correlates in iron overload associated with mutations in ferroportin. *Haematologica* **91**, 1092–5.
- De Domenico, I., Ward, D. M., Musci, G. and Kaplan, J.** (2007a). Evidence for the multimeric structure of ferroportin. *Blood* **109**, 2205–2209.
- De Domenico, I., Vaughn, M. B., Yoon, D., Kushner, J. P., Ward, D. M. and Kaplan, J.** (2007b). Zebrafish as a model for defining the functional impact of mammalian ferroportin mutations. *Blood* **110**, 3780–3.
- Decrouy, A., Juteau, M., Proteau, S., Teijiera, J. and Rousseau, E.** (1996). Biochemical Regulation of Sarcoplasmic Reticulum Cl<sup>-</sup> Channel From Human Atrial Myocytes: Involvement of Phospholamban. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **28**, 767–780.
- DeFaveri, J., Shikano, T., Shimada, Y., Goto, A. and Merilä, J.** (2011). Global analysis of genes involved in freshwater adaptation in threespine sticklebacks ( *Gasterosteus aculeatus*). *Evolution (N. Y.)* **65**, 1800–1807.

- Depienne, C., Bugiani, M., Dupuits, C., Galanaud, D., Touitou, V., Postma, N., van Berkel, C., Polder, E., Tollard, E., Darios, F., et al.** (2013). Brain white matter oedema due to CIC-2 chloride channel deficiency: an observational analytical study. *Lancet Neurol.* **12**, 659–668.
- Deretic, D., Schmerl, S., Hargrave, P. A., Arendt, A. and McDowell, J. H.** (1998). Regulation of sorting and post-Golgi trafficking of rhodopsin by its C-terminal sequence QVS(A)PA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 10620–5.
- Desjarlais, J. R. and Berg, J. M.** (1992). Toward rules relating zinc finger protein sequences and DNA binding site preferences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 7345–9.
- Dhani, S. U., Kim Chiaw, P., Huan, L.-J. and Bear, C. E.** (2008). ATP depletion inhibits the endocytosis of CIC-2. *J. Cell. Physiol.* **214**, 273–280.
- Di Bella, D., Pareyson, D., Savoiaro, M., Farina, L., Ciano, C., Caldarazzo, S., Sagnelli, A., Bonato, S., Nava, S., Bresolin, N., et al.** (2014). Subclinical leukodystrophy and infertility in a man with a novel homozygous *CLCN2* mutation. *Neurology* **83**, 1217–1218.
- Di Stasio, E.** (2004). Anionic regulation of biological systems: the special role of chloride in the coagulation cascade. *Biophys. Chem.* **112**, 245–252.
- DiCarlo, J. E., Norville, J. E., Mali, P., Rios, X., Aach, J. and Church, G. M.** (2013). Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res.* **41**, 4336–4343.
- Dmytrenko, L., Cicanic, M., Anderova, M., Vorisek, I., Ottersen, O. P., Sykova, E. and Vargova, L.** (2013). The impact of alpha-syntrophin deletion on the changes in tissue structure and extracellular diffusion associated with cell swelling under physiological and pathological conditions. *PLoS One* **8**, e68044.
- Dou, Y., Andersson-Lendahl, M. and Arner, A.** (2008). Structure and Function of Skeletal Muscle in Zebrafish Early Larvae. *J. Gen. Physiol.* **131**, 445–453.
- Dowling, J. J., Vreede, A. P., Low, S. E., Gibbs, E. M., Kuwada, J. Y., Bonnemann, C. G. and Feldman, E. L.** (2009). Loss of Myotubularin Function Results in T-Tubule Disorganization in Zebrafish and Human Myotubular Myopathy. *PLoS Genet.* **5**, e1000372.
- Doyon, Y., McCammon, J. M., Miller, J. C., Faraji, F., Ngo, C., Katibah, G. E., Amora, R., Hocking, T. D., Zhang, L., Rebar, E. J., et al.** (2008). Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases. *Nat. Biotechnol.* **26**, 702–708.
- Draper, B. W., Morcos, P. A. and Kimmel, C. B.** (2001). Inhibition of zebrafish *fgf8* pre-mRNA splicing with morpholino oligos: a quantifiable method for gene knockdown. *Genesis* **30**, 154–6.
- Driever, W., Solnica-Krezel, L., Schier, A. F., Neuhauss, S. C., Malicki, J., Stemple, D. L., Stainier, D. Y., Zwartkruis, F., Abdelilah, S., Rangini, Z., et al.** (1996). A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development* **123**, 37–46.
- Duan, D., Hume, J. R. and Nattel, S.** (1997). Evidence that outwardly rectifying Cl<sup>-</sup> channels underlie volume-regulated Cl<sup>-</sup> currents in heart. *Circ. Res.* **80**, 103–13.
- Duan, D., Ye, L., Britton, F., Horowitz, B. and Hume, J. R.** (2000). A Novel Anionic Inward

- Rectifier in Native Cardiac Myocytes. *Circ. Res.* **86**,.
- Dunø, M., Colding-Jørgensen, E., Grunnet, M., Jespersen, T., Vissing, J. and Schwartz, M.** (2004). Difference in allelic expression of the *CLCN1* gene and the possible influence on the myotonia congenita phenotype. *Eur. J. Hum. Genet.* **12**, 738–743.
- Duran, C., Thompson, C. H., Xiao, Q. and Hartzell, H. C.** (2010). Chloride channels: often enigmatic, rarely predictable. *Annu. Rev. Physiol.* **72**, 95–121.
- Dutka, T. L., Murphy, R. M., Stephenson, D. G. and Lamb, G. D.** (2008). Chloride conductance in the transverse tubular system of rat skeletal muscle fibres: importance in excitation-contraction coupling and fatigue. *J. Physiol.* **586**, 875–87.
- Dutzler, R., Campbel, E. B., Cadene, M., Chait, B. T. and MacKinnon, R.** (2002). X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature* **415**, 287–294.
- Dymowska, A. K., Hwang, P.-P. and Goss, G. G.** (2012). Structure and function of ionocytes in the freshwater fish gill. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **184**, 282–292.
- Eaton, R. C. and Didomenico, R.** (1986). Role of the Teleost Escape Response during Development. *Trans. Am. Fish. Soc.* **115**, 128–142.
- Ehrlich, J., Sankof, D. and Nadeau, J. H.** Synteny Conservation and Chromosome Rearrangements During Mammalian Evolution.
- Einbond, A. and Sudol, M.** (1996). Towards prediction of cognate complexes between the WW domain and proline-rich ligands. *FEBS Lett.* **384**, 1–8.
- Eisenberg, I., Eran, A., Nishino, I., Moggio, M., Lamperti, C., Amato, A. A., Lidov, H. G., Kang, P. B., North, K. N., Mitrani-Rosenbaum, S., et al.** (2007). Distinctive patterns of microRNA expression in primary muscular disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 17016–21.
- Ek, F., Malo, M., Åberg Andersson, M., Wedding, C., Kronborg, J., Svensson, P., Waters, S., Petersson, P. and Olsson, R.** (2016). Behavioral Analysis of Dopaminergic Activation in Zebrafish and Rats Reveals Similar Phenotypes. *ACS Chem. Neurosci.* **7**, 633–646.
- Embark, H. M., Böhmer, C., Palmada, M., Rajamanickam, J., Wyatt, A. W., Wallisch, S., Capasso, G., Waldegger, P., Seyberth, H. W., Waldegger, S., et al.** (2004). Regulation of CLC-Ka/barttin by the ubiquitin ligase Nedd4-2 and the serum- and glucocorticoid-dependent kinases. *Kidney Int.* **66**, 1918–1925.
- Emery, A. E.** (1993). Duchenne muscular dystrophy--Meryon's disease. *Neuromuscul. Disord.* **3**, 263–6.
- Ervasti, J. M. and Sonnemann, K. J.** (2008). Biology of the striated muscle dystrophin-glycoprotein complex. *Int. Rev. Cytol.* **265**, 191–225.
- Estévez, R., Boettger, T., Stein, V., Birkenhäger, R., Otto, E., Hildebrandt, F. and Jentsch, T. J.** (2001). Barttin is a Cl<sup>-</sup> channel beta-subunit crucial for renal Cl<sup>-</sup> reabsorption and inner ear K<sup>+</sup> secretion. *Nature* **414**, 558–61.
- Estévez, R., Schroeder, B. C., Accardi, A., Jentsch, T. J. and Pusch, M.** (2003). Conservation of chloride channel structure revealed by an inhibitor binding site in ClC-1.

- Neuron* **38**, 47–59.
- Estévez, R., Pusch, M., Ferrer-Costa, C., Orozco, M. and Jentsch, T. J.** (2004). Functional and structural conservation of CBS domains from CLC chloride channels. *J. Physiol.* **557**, 363–78.
- Fahlke, C., Jdel, R. R., Mitrovic, N., Zhou, M. and George, A. L.** (1995). An Aspartic Acid Residue Important for Voltage-Dependent Gating of Human Muscle Chloride Channels. *Neuron* **15**, 463–472.
- Fahlke, C., Dürr, C., George, A. L. and Jr.** (1997). Mechanism of ion permeation in skeletal muscle chloride channels. *J. Gen. Physiol.* **110**, 551–64.
- Fenton, R. A. and Knepper, M. A.** (2007). Mouse Models and the Urinary Concentrating Mechanism in the New Millennium. *Physiol. Rev.* **87**, 1083–1112.
- Ferguson-Smith, M. A. and Trifonov, V.** (2007). Mammalian karyotype evolution. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 950–962.
- Fialho, D., Kullmann, D. M., Hanna, M. G., Schorge, S., Lowe, K. E., Maiyar, A. C. and al., et** (2008). Non-genomic effects of sex hormones on CLC-1 may contribute to gender differences in myotonia congenita. *Neuromuscul. Disord.* **18**, 869–72.
- Fischer, M., Janssen, A. G. H. and Fahlke, C.** (2010). Barttin Activates ClC-K Channel Function by Modulating Gating. *J. Am. Soc. Nephrol.* **21**, 1281–1289.
- Földy, C., Lee, S.-H., Morgan, R. J. and Soltesz, I.** (2010). Regulation of fast-spiking basket cell synapses by the chloride channel ClC-2. *Nat. Neurosci.* **13**, 1047–9.
- Fraser, J. A., Skepper, J. N., Hockaday, A. R. and Huang, C. L.** (1998). The tubular vacuolation process in amphibian skeletal muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **19**, 613–29.
- Freeble, C. R. and Rini, J. M.** (1949). Myotonia congenita (Thomsen's disease) report of a case. *Ohio State Med. J.* **45**, 459.
- Friedland, A. E., Tzur, Y. B., Esvelt, K. M., Colaiácovo, M. P., Church, G. M. and Calarco, J. A.** (2013). Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system. *Nat. Methods* **10**, 741–743.
- Fritsch, J. and Edelman, A.** (1996). Modulation of the hyperpolarization-activated Cl<sup>-</sup> current in human intestinal T84 epithelial cells by phosphorylation. *J. Physiol.* 115–28.
- Furman, R. E. and Barchi, R. L.** (1978). The pathophysiology of myotonia produced by aromatic carboxylic acids. *Ann. Neurol.* **4**, 357–65.
- Furukawa, T., Ogura, T., Katayama, Y. and Hiraoka, M.** (1998). Characteristics of rabbit ClC-2 current expressed in *Xenopus* oocytes and its contribution to volume regulation. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **274**,.
- Gaitán-Peñas, H., Gradogna, A., Laparra-Cuervo, L., Solsona, C., Fernández-Dueñas, V., Barrallo-Gimeno, A., Ciruela, F., Lakadamyali, M., Pusch, M. and Estévez, R.** (2016). Investigation of LRRC8-Mediated Volume-Regulated Anion Currents in *Xenopus* Oocytes. *Biophys. J.* **111**, 1429–1443.
- Gilbert, G. J.** (1978). Quinidine dementia. *Am. J. Cardiol.* **41**, 791.
- Gorissen, M., Manuel, R., Pelgrim, T. N. M., Mes, W., de Wolf, M. J. S., Zethof, J., Flik, G.**



- and van den Bos, R.** (2015). Differences in inhibitory avoidance, cortisol and brain gene expression in TL and AB zebrafish. *Genes, Brain Behav.* **14**, 428–438.
- Gradogna, A., Babini, E., Picollo, A. and Pusch, M.** (2010). A regulatory calcium-binding site at the subunit interface of CLC-K kidney chloride channels. *J. Gen. Physiol.* **136**, 311–323.
- Gradogna, A., Fenollar-Ferrer, C., Forrest, L. R. and Pusch, M.** (2012). Dissecting a regulatory calcium-binding site of CLC-K kidney chloride channels. *J. Gen. Physiol.* **140**, 681–96.
- Granato, M., van Eeden, F. J., Schach, U., Trowe, T., Brand, M., Furutani-Seiki, M., Haffter, P., Hammerschmidt, M., Heisenberg, C. P., Jiang, Y. J., et al.** (1996). Genes controlling and mediating locomotion behavior of the zebrafish embryo and larva. *Development* **123**, 399–413.
- Gratz, S. J., Cummings, A. M., Nguyen, J. N., Hamm, D. C., Donohue, L. K., Harrison, M. M., Wildonger, J. and O'Connor-Giles, K. M.** (2013). Genome Engineering of Drosophila with the CRISPR RNA-Guided Cas9 Nuclease. *Genetics* **194**, 1029–1035.
- Griffin, A., Hamling, K. R., Knupp, K., Hong, S., Lee, L. P. and Baraban, S. C.** (2017). Clemizole and modulators of serotonin signalling suppress seizures in Dravet syndrome. *Brain* **7**, aww342.
- Gründer, S., Thiemann, A., Pusch, M. and Jentsch, T. J.** (1992). Regions involved in the opening of ClC-2 chloride channel by voltage and cell volume. *Nature* **360**, 759–762.
- Grunwald, D. J. and Streisinger, G.** (1992). Induction of recessive lethal and specific locus mutations in the zebrafish with ethyl nitrosourea. *Genet. Res.* **59**, 103–16.
- Guerrini, R., Dravet, C., Genton, P., Belmonte, A., Kaminska, A. and Dulac, O.** (1998). Lamotrigine and seizure aggravation in severe myoclonic epilepsy. *Epilepsia* **39**, 508–12.
- Gundry, C. N., Vandersteen, J. G., Reed, G. H., Pryor, R. J., Chen, J. and Wittwer, C. T.** (2003). Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. *Clin. Chem.* **49**, 396–406.
- Guyon, J. R., Mosley, A. N., Zhou, Y., O'Brien, K. F., Sheng, X., Chiang, K., Davidson, A. J., Volinski, J. M., Zon, L. I. and Kunkel, L. M.** (2003). The dystrophin associated protein complex in zebrafish. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 601–15.
- Haffter, P. and Nüsslein-Volhard, C.** (1996). Large scale genetics in a small vertebrate, the zebrafish. *Int. J. Dev. Biol.* **40**, 221–7.
- Haj-Yasein, N. N., Jensen, V., Østby, I., Omholt, S. W., Voipio, J., Kaila, K., Ottersen, O. P., Hvalby, Ø. and Nagelhus, E. A.** (2012). Aquaporin-4 regulates extracellular space volume dynamics during high-frequency synaptic stimulation: A gene deletion study in mouse hippocampus. *Glia* **60**, 867–874.
- Hammerschmidt, M., Pelegri, F., Mullins, M. C., Kane, D. A., Brand, M., van Eeden, F. J., Furutani-Seiki, M., Granato, M., Haffter, P., Heisenberg, C. P., et al.** (1996). Mutations affecting morphogenesis during gastrulation and tail formation in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* **123**, 143–51.
- Haug, K., Warnstedt, M., Alekov, A. K., Sander, T., Ramírez, A., Poser, B., Maljevic, S.,**

- Hebeisen, S., Kubisch, C., Rebstock, J., et al.** (2003). Mutations in *CLCN2* encoding a voltage-gated chloride channel are associated with idiopathic generalized epilepsies. *Nat. Genet.* **33**, 527–32.
- Hayama, A., Rai, T., Sasaki, S. and Uchida, S.** (2003). Molecular mechanisms of Bartter syndrome caused by mutations in the *BSND* gene. *Histochem. Cell Biol.* **119**, 485–493.
- Hennings, J. C., Andrini, O., Picard, N., Paulais, M., Huebner, A. K., Cayuqueo, I. K. L., Bignon, Y., Keck, M., Cornière, N., Böhm, D., et al.** (2017). The CIC-K2 Chloride Channel Is Critical for Salt Handling in the Distal Nephron. *J. Am. Soc. Nephrol.* **28**, 209–217.
- Hetheridge, C., Scott, A. N., Swain, R. K., Copeland, J. W., Higgs, H. N., Bicknell, R. and Mellor, H.** (2012). The formin FMNL3 is a cytoskeletal regulator of angiogenesis. *J. Cell Sci.* **125**, 1420–1428.
- Higgs, D. M., Souza, M. J., Wilkins, H. R., Presson, J. C. and Popper, A. N.** (2002). Age- and size-related changes in the inner ear and hearing ability of the adult zebrafish (*Danio rerio*). *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* **3**, 174–84.
- Hinzpeter, A., Lipecka, J., Brouillard, F., Baudoin-Legros, M., Dadlez, M., Edelman, A. and Fritsch, J.** (2005). Association between Hsp90 and the CIC-2 chloride channel upregulates channel function. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **290**,.
- Hirata, H., Saint-Amant, L., Waterbury, J., Cui, W., Zhou, W., Li, Q., Goldman, D., Granato, M. and Kuwada, J. Y.** (2004). accordion, a zebrafish behavioral mutant, has a muscle relaxation defect due to a mutation in the ATPase Ca<sup>2+</sup> pump SERCA1. *Development* **131**,.
- Hirata, H., Watanabe, T., Hatakeyama, J., Sprague, S. M., Saint-Amant, L., Nagashima, A., Cui, W. W., Zhou, W. and Kuwada, J. Y.** (2007). Zebrafish relatively relaxed mutants have a ryanodine receptor defect, show slow swimming and provide a model of multi-minicore disease. *Development* **134**, 2771–2781.
- Hockemeyer, D., Wang, H., Kiani, S., Lai, C. S., Gao, Q., Cassady, J. P., Cost, G. J., Zhang, L., Santiago, Y., Miller, J. C., et al.** (2011). Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nat. Biotechnol.* **29**, 731–734.
- Hoegg-Beiler, M. B., Sirisi, S., Orozco, I. J., Ferrer, I., Hohensee, S., Auberson, M., Gödde, K., Vilches, C., de Heredia, M. L., Nunes, V., et al.** (2014). Disrupting MLC1 and GlialCAM and CIC-2 interactions in leukodystrophy entails glial chloride channel dysfunction. *Nat. Commun.* **5**, 763–769.
- Hogben, C. A. M.** (1959). Physiochemical aspects of hydrochloric acid formation. *Am. J. Dig. Dis.* **4**, 184–193.
- Horstick, E. J., Gibbs, E. M., Li, X., Davidson, A. E. and Dowling, J. J.** (2013). Analysis of embryonic and larval zebrafish skeletal myofibers from dissociated preparations. *J. Vis. Exp.* e50259.
- Hosseinzadeh, Z., Bhavsar, S. K. and Lang, F.** (2012). Downregulation of CIC-2 by JAK2. *Cell. Physiol. Biochem.* **29**, 737–42.

- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J. E. J. E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., et al. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* **496**, 498–503.
- Hryciw, D. H., Ekberg, J., Lee, A., Lensink, I. L., Kumar, S., Guggino, W. B., Cook, D. I., Pollock, C. A. and Poronnik, P. (2004). Nedd4-2 Functionally Interacts with CIC-5: involvement in constitutive albumin endocytosis in proximal tubule cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 54996–55007.
- Huang, Z. M., Prasad, C., Britton, F. C., Ye, L. L., Hatton, W. J., Duan, D. and al., et (2009). Functional role of CLC-2 chloride inward rectifier channels in cardiac sinoatrial nodal pacemaker cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **47**, 121–32.
- Hume, J. R., Duan, D., Collier, M. L., Yamazaki, J. and Horowitz, B. (2000). Anion Transport in Heart. *Physiol. Rev.* **80**,.
- Huynen, M. A. and Bork, P. (1998). Measuring genome evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 5849–56.
- Hwang, W. Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M. L., Tsai, S. Q., Sander, J. D., Peterson, R. T., Yeh, J. R. and Joung, J. K. (2013). Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol* **31**, 227–229.
- Ignoul, S. and Eggermont, J. (2005). CBS domains: structure, function, and pathology in human proteins. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **289**,.
- Imai, M. and Kokko, J. P. (1974). Sodium chloride, urea, and water transport in the thin ascending limb of Henle. Generation of osmotic gradients by passive diffusion of solutes. *J. Clin. Invest.* **53**, 393–402.
- Irwin, W. A., Bergamin, N., Sabatelli, P., Reggiani, C., Megighian, A., Merlini, L., Braghetta, P., Columbaro, M., Volpin, D., Bressan, G. M., et al. (2003). Mitochondrial dysfunction and apoptosis in myopathic mice with collagen VI deficiency. *Nat. Genet.* **35**, 367–371.
- Ivanova, E. A., Dadali, E. L., Fedotov, V. P., Kurbatov, S. A., Rudenskaya, G. E., Proskokova, T. N. and Polyakov, A. V. (2012). The spectrum of *CLCN1* gene mutations in patients with nondystrophic Thomsen's and Becker's myotonias. *Russ. J. Genet.* **48**, 952–961.
- Jao, L.-E., Wente, S. R. and Chen, W. (2013). Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 13904–9.
- Jentsch, T. J. (2015). Discovery of CLC transport proteins: cloning, structure, function and pathophysiology. *J. Physiol.* **0**, n/a-n/a.
- Jentsch, T. J., Steinmeyer, K. and Schwarz, G. (1990). Primary structure of Torpedo marmorata chloride channel isolated by expression cloning in *Xenopus* oocytes. *Nature* **348**, 510–514.
- Jentsch, T. J., Friedrich, T., Schriever, A. and Yamada, H. (1999). The CLC chloride channel family. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **437**, 783–795.
- Jeworutzki, E., López-Hernández, T., Capdevila-Nortes, X., Sirisi, S., Bengtsson, L., Montolio, M., Zifarelli, G., Arnedo, T., Müller, C. S., Schulte, U., et al. (2012). GlialCAM,

- a protein defective in a leukodystrophy, serves as a CLC-2 Cl<sup>-</sup> channel auxiliary subunit. *Neuron* **73**, 951–61.
- Jeworutzki, E., Lagostena, L., Elorza-Vidal, X., López-Hernández, T., Estévez, R. and Pusch, M.** (2014). GlialCAM, a CLC-2 Cl<sup>-</sup> Channel Subunit, Activates the Slow Gate of CLC Chloride Channels. *Biophys. J.* **107**, 1105–1116.
- Jiang, W., Bikard, D., Cox, D., Zhang, F. and Marraffini, L. A.** (2013). RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat. Biotechnol.* **31**, 233–239.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A. and Charpentier, E.** (2012). A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science (80-. ).* **337**, 816–821.
- Jöbsis, G. J., Keizers, H., Vreijling, J. P., Visser, M. de, Speer, M. C., Wolterman, R. A., Baas, F. and Bolhuis, P. A.** (1996). Type VI collagen mutations in Bethlem myopathy, an autosomal dominant myopathy with contractures. *Nat. Genet.* **14**, 113–115.
- Jockusch, H., Reininghaus, J., Stuhlfauth, I. and Zippel, M.** (1988). Reduction of myosin-light-chain phosphorylation and of parvalbumin content in myotonic mouse muscle and its reversal by tocainide. *Eur. J. Biochem.* **171**, 101–5.
- Johnson, A. G., Day, R. O. and Seldon, W. A.** (1990). A functional psychosis precipitated by quinidine. *Med. J. Aust.* **153**, 47–9.
- Jordt, S. E. and Jentsch, T. J.** (1997). Molecular dissection of gating in the CLC-2 chloride channel. *EMBO J.* **16**, 1582–92.
- Jurkat-Rott, K., Fauler, M. and Lehmann-Horn, F.** (2006). Ion channels and ion transporters of the transverse tubular system of skeletal muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **27**, 275–290.
- Kahle, K. T., Ring, A. M. and Lifton, R. P.** (2008). Molecular Physiology of the WNK Kinases. *Annu. Rev. Physiol.* **70**, 329–355.
- Kajita, H., Omori, K. and Matsuda, H.** (2000). The chloride channel CLC-2 contributes to the inwardly rectifying Cl<sup>-</sup> conductance in cultured porcine choroid plexus epithelial cells. *J. Physiol.* **523 Pt 2**, 313–24.
- Kalsi, A. S., Greenwood, K., Wilkin, G. and Butt, A. M.** (2004). K<sub>ir4.1</sub> expression by astrocytes and oligodendrocytes in CNS white matter: a developmental study in the rat optic nerve. *J. Anat.* **204**, 475–85.
- Kappé, G., Franck, E., Verschuure, P., Boelens, W. C., Leunissen, J. A. M. and de Jong, W. W.** (2003). The human genome encodes 10 alpha-crystallin-related small heat shock proteins: HspB1-10. *Cell Stress Chaperones* **8**, 53–61.
- Kawahara, G. and Karpf, J.** (2011). Drug screening in a zebrafish model of Duchenne muscular dystrophy. *Pnas* **108**, 5331–6.
- Kawakami, K. and Shima, A.** (1999). Identification of the Tol2 transposase of the medaka fish *Oryzias latipes* that catalyzes excision of a nonautonomous Tol2 element in zebrafish *Danio rerio*. *Gene* **240**, 239–44.
- Kawakami, K., Takeda, H., Kawakami, N., Kobayashi, M., Matsuda, N., Mishina, M., Joly, J.**

- S., Eeden, F. J. M. van, Jiang, Y.-J., Heisenberg, C.-P., et al.** (2004). A transposon-mediated gene trap approach identifies developmentally regulated genes in zebrafish. *Dev. Cell* **7**, 133–44.
- Kerem, B., Rommens, J., Buchanan, J., Markiewicz, D., Cox, T., Chakravarti, A., Buchwald, M. and Tsui, L.** (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science (80-. )*. **245**,.
- Kettleborough, R. N., Busch-Nentwich, E. M., Harvey, S. A., Dooley, C. M., de Bruijn, E., van Eeden, F., Sealy, I., White, R. J., Herd, C., Nijman, I. J., et al.** (2013). A systematic genome-wide analysis of zebrafish protein-coding gene function. *Nature* **496**, 494–497.
- Keynes, R. D.** (1963). Chloride in the squid giant axon. *J. Physiol.* **169**, 690–705.
- Kieferle, S., Fong, P., Bens, M., Vandewalle, A. and Jentsch, T. J.** (1994). Two highly homologous members of the ClC chloride channel family in both rat and human kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 6943–7.
- Kim, H. and Kim, J.-S.** (2014). A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nat. Rev. Genet.* **15**, 321–334.
- Kim, Y. G., Cha, J. and Chandrasegaran, S.** (1996). Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 1156–60.
- Kimelberg, H. K., Macvicar, B. A. and Sontheimer, H.** (2006). Anion channels in astrocytes: biophysics, pharmacology, and function. *Glia* **54**, 747–57.
- Kimmel, C. B., Patterson, J. and Kimmel, R. O.** (1974). The development and behavioral characteristics of the startle response in the zebra fish. *Dev. Psychobiol.* **7**, 47–60.
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. and Schilling, T. F.** (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn. an Off. public* **203**, 253–310.
- Kobayashi, K., Uchida, S., Mizutani, S., Sasaki, S. and Marumo, F.** (2001). Developmental expression of CLC-K1 in the postnatal rat kidney. *Histochem. Cell Biol.* **116**, 49–56.
- Kobayashi, K., Uchida, S., Okamura, H.-O., Marumo, F. and Sasaki, S.** (2002). Human CLC-KB gene promoter drives the EGFP expression in the specific distal nephron segments and inner ear. *J. Am. Soc. Nephrol.* **13**, 1992–8.
- Koch, M. C., Steinmeyer, K., Lorenz, C., Ricker, K., Wolf, F., Otto, M., Zoll, B., Lehmann-Horn, F., Grzeschik, K. H. and Jentsch, T. J.** (1992). The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia. *Science* **257**, 797–800.
- Kofuji, P. and Newman, E. A.** (2004). Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience* **129**, 1045–56.
- Kok, F. O., Shin, M., Ni, C.-W., Gupta, A., Grosse, A. S., van Impel, A., Kirchmaier, B. C., Peterson-Maduro, J., Kourkoulis, G., Male, I., et al.** (2015). Reverse genetic screening reveals poor correlation between morpholino-induced and mutant phenotypes in zebrafish. *Dev. Cell* **32**, 97–108.
- Komwatana, P., Dinudom, A., Young, J. A. and Cook, D. I.** (1994). Characterization of the Cl<sup>-</sup> conductance in the granular duct cells of mouse mandibular glands. *Pflugers Arch.* **428**,

641–7.

- Köprunner, M., Thisse, C., Thisse, B. and Raz, E.** (2001). A zebrafish *nanos*-related gene is essential for the development of primordial germ cells. *Genes Dev.* **15**, 2877–85.
- Koty, P. P., Pegoraro, E., Hobson, G., Marks, H. G., Turel, A., Flagler, D., Cadaldini, M., Angelini, C. and Hoffman, E. P.** (1996). Myotonia and the muscle chloride channel: dominant mutations show variable penetrance and founder effect. *Neurology* **47**, 963–8.
- Kristensen, M., Hansen, T. and Juel, C.** (2006). Membrane proteins involved in potassium shifts during muscle activity and fatigue. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **290**,.
- Kubisch, C., Schmidt-Rose, T., Fontaine, B., Bretag, A. H. and Jentsch, T. J.** (1998). ClC-1 chloride channel mutations in myotonia congenita: variable penetrance of mutations shifting the voltage dependence. *Hum. Mol. Genet.* **7**, 1753–60.
- Lamason, R. L., Mohideen, M.-A. P. K., Mest, J. R., Wong, A. C., Norton, H. L., Aros, M. C., Jurynec, M. J., Mao, X., Humphreville, V. R., Humbert, J. E., et al.** (2005). *SLC24A5*, a Putative Cation Exchanger, Affects Pigmentation in Zebrafish and Humans. *Science* (80-). **310**,.
- Landy, A.** (1989). Dynamic, Structural, and Regulatory Aspects of lambda Site-Specific Recombination. *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 913–941.
- Lange, P. F., Wartosch, L., Jentsch, T. J. and Fuhrmann, J. C.** (2006). ClC-7 requires Ostm1 as a  $\beta$ -subunit to support bone resorption and lysosomal function. *Nature* **440**, 220–223.
- Langheinrich, U.** (2003). Zebrafish: A new model on the pharmaceutical catwalk. *BioEssays* **25**, 904–912.
- Leegwater, P. A., Yuan, B. Q., van der Steen, J., Mulders, J., Könst, A. A., Boor, P. K., Mejaski-Bosnjak, V., van der Maarel, S. M., Frants, R. R., Oudejans, C. B., et al.** (2001). Mutations of *MLC1* (KIAA0027), encoding a putative membrane protein, cause megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Am. J. Hum. Genet.* **68**, 831–8.
- Li, W.-H., Yang, J. and Gu, X.** (2005). Expression divergence between duplicate genes. *Trends Genet.* **21**, 602–607.
- Liang, L., Deng, L., Chen, Y., Li, G. C., Shao, C. and Tischfield, J. A.** (2005). Modulation of DNA End Joining by Nuclear Proteins. *J. Biol. Chem.* **280**, 31442–31449.
- Liantonio, A., De Luca, A., Pierno, S., Didonna, M. P., Liodice, F., Fracchiolla, G., Tortorella, P., Laghezza, A., Bonerba, E., Traverso, S., et al.** (2003). Structural requisites of 2-(*p*-chlorophenoxy)propionic acid analogues for activity on native rat skeletal muscle chloride conductance and on heterologously expressed CLC-1. *Br. J. Pharmacol.* **139**, 1255–1264.
- Liantonio, A., Giannuzzi, V., Picollo, A., Babini, E., Pusch, M. and Conte Camerino, D.** (2007). Niflumic acid inhibits chloride conductance of rat skeletal muscle by directly inhibiting the CLC-1 channel and by increasing intracellular calcium. *Br. J. Pharmacol.* **150**, 235–247.

- Liantonio, A., Picollo, A., Carbonara, G., Fracchiolla, G., Tortorella, P., Loiodice, F., Laghezza, A., Babini, E., Zifarelli, G., Pusch, M., et al.** (2008). Molecular switch for CLC-K Cl<sup>-</sup> channel block/activation: Optimal pharmacophoric requirements towards high-affinity ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 1369–1373.
- Lipicky, R. J., Bryant, S. H. and Salmon, J. H.** (1971). Cable parameters, sodium, potassium, chloride, and water content, and potassium efflux in isolated external intercostal muscle of normal volunteers and patients with myotonia congenita. *J. Clin. Invest.* **50**, 2091–103.
- Lipscomb, L., Piggott, R. W., Emmerson, T. and Winder, S. J.** (2016). Dasatinib as a treatment for Duchenne muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **25**, 266–274.
- Liu, J., Li, C., Yu, Z., Huang, P., Wu, H., Wei, C., Zhu, N., Shen, Y., Chen, Y., Zhang, B., et al.** (2012). Efficient and Specific Modifications of the Drosophila Genome by Means of an Easy TALEN Strategy. *J. Genet. Genomics* **39**, 209–215.
- Lopez-Hernandez, T., Sirisi, S., Capdevila-Nortes, X., Montolio, M., Fernandez-Duenas, V., Scheper, G. C., van der Knaap, M. S., Casquero, P., Ciruela, F., Ferrer, I., et al.** (2011). Molecular mechanisms of *MLC1* and *GLIALCAM* mutations in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 3266–3277.
- López-Hernández, T., Ridder, M. C., Montolio, M., Capdevila-Nortes, X., Polder, E., Sirisi, S., Duarri, A., Schulte, U., Fakler, B., Nunes, V., et al.** (2011). Mutant *GlialCAM* causes megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts, benign familial macrocephaly, and macrocephaly with retardation and autism. *Am. J. Hum. Genet.* **88**, 422–32.
- Lossin, C. and George, A. L.** (2008). *Chapter 2 Myotonia Congenita*. 1st ed. Elsevier Inc.
- Lueck, J. D., Rossi, A. E., Thornton, C. a, Campbell, K. P. and Dirksen, R. T.** (2010). Sarcolemmal-restricted localization of functional ClC-1 channels in mouse skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* **136**, 597–613.
- MacLennan, D. H.** (2000). Ca<sup>2+</sup> signalling and muscle disease. *Eur. J. Biochem.* **267**, 5291–7.
- Makara, J. K., Rappert, A., Matthias, K., Steinhäuser, C., Spät, A. and Kettenmann, H.** (2003). Astrocytes from mouse brain slices express ClC-2-mediated Cl<sup>-</sup> currents regulated during development and after injury. *Mol. Cell. Neurosci.* **23**, 521–530.
- Makarova, K. S. and Koonin, E. V.** (2015). Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, pp. 47–75.
- Makarova, K. S., Haft, D. H., Barrangou, R., Brouns, S. J. J., Charpentier, E., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J. M., Wolf, Y. I., Yakunin, A. F., et al.** (2011). Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 467–477.
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., Norville, J. E. and Church, G. M.** (2013). RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. *Science (80-)*. **339**, 823–826.
- Mankodi, A., Takahashi, M. P., Jiang, H., Beck, C. L., Bowers, W. J., Moxley, R. T., Cannon, S. C., Thornton, C. A., Bronson, R., Cros, D., et al.** (2002). Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of ClC-1 chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability

- of skeletal muscle in myotonic dystrophy. *Mol. Cell* **10**, 35–44.
- Markovic, S. and Dutzler, R.** (2007). The structure of the cytoplasmic domain of the chloride channel ClC-Ka reveals a conserved interaction interface. *Structure* **15**, 715–25.
- Martinez, G. Q. and Maduke, M.** (2008). A cytoplasmic domain mutation in ClC-Kb affects long-distance communication across the membrane. *PLoS One* **3**, e2746.
- Matsumura, Y., Uchida, S., Kondo, Y., Miyazaki, H., Ko, S. B., Hayama, A., Morimoto, T., Liu, W., Arisawa, M., Sasaki, S., et al.** (1999). Overt nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking the CLC-K1 chloride channel. *Nat. Genet.* **21**, 95–8.
- McWhorter, M. L., Monani, U. R., Burghes, A. H. M. and Beattie, C. E.** (2003). Knockdown of the survival motor neuron (Smn) protein in zebrafish causes defects in motor axon outgrowth and pathfinding. *J. Cell Biol.* **162**, 919–932.
- Meng, X., Noyes, M. B., Zhu, L. J., Lawson, N. D. and Wolfe, S. A.** (2008). Targeted gene inactivation in zebrafish using engineered zinc-finger nucleases. *Nat. Biotechnol.* **26**, 695–701.
- Menichella, D. M., Majdan, M., Awatramani, R., Goodenough, D. A., Sirkowski, E., Scherer, S. S. and Paul, D. L.** (2006). Genetic and Physiological Evidence That Oligodendrocyte Gap Junctions Contribute to Spatial Buffering of Potassium Released during Neuronal Activity. *J. Neurosci.* **26**,.
- Merlini, L., Angelin, A., Tiepolo, T., Braghetta, P., Sabatelli, P., Zamparelli, A., Ferlini, A., Maraldi, N. M., Bonaldo, P. and Bernardi, P.** (2008). Cyclosporin A corrects mitochondrial dysfunction and muscle apoptosis in patients with collagen VI myopathies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 5225–5229.
- Merritt Maduke, Carole Williams, and and Miller\*, C.** (1998). Formation of CLC-0 Chloride Channels from Separated Transmembrane and Cytoplasmic Domains.
- Meyer-Kleine, C., Steinmeyer, K., Ricker, K., Jentsch, T. J. and Koch, M. C.** (1995). Spectrum of mutations in the major human skeletal muscle chloride channel gene (*CLCN1*) leading to myotonia. *Am. J. Hum. Genet.* **57**, 1325–34.
- Miller, C.** (1982). Open-State Substructure of Single Chloride Channels from *Torpedo Electropax*. *Philos. Trans. R. Soc. London B Biol. Sci.* **299**,.
- Miller, C. and White, M. M.** (1980). A voltage-dependent chloride conductance channel from *Torpedo electropax* membrane. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **341**, 534–51.
- Miller, J. C., Holmes, M. C., Wang, J., Guschin, D. Y., Lee, Y.-L., Rupniewski, I., Beausejour, C. M., Waite, A. J., Wang, N. S., Kim, K. A., et al.** (2007). An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nat. Biotechnol.* **25**, 778–785.
- Miller, J. C., Tan, S., Qiao, G., Barlow, K. A., Wang, J., Xia, D. F., Meng, X., Paschon, D. E., Leung, E., Hinkley, S. J., et al.** (2011). A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat. Biotechnol.* **29**, 143–148.
- Mishima, Y., Giraldez, A. J., Takeda, Y., Fujiwara, T., Sakamoto, H., Schier, A. F. and Inoue, K.** (2006). Differential Regulation of Germline mRNAs in Soma and Germ Cells by



- Zebrafish miR-430. *Curr. Biol.* **16**, 2135–2142.
- Mishina, M., Takai, T., Imoto, K., Noda, M., Takahashi, T., Numa, S., Methfessel, C. and Sakmann, B.** (1986). Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor. *Nature* **321**, 406–411.
- Moeser, A. J., Haskell, M. M., Shifflett, D. E., Little, D., Schultz, B. D., Blikslager, A. T., Guggino, W. B., Cutting, G. R., Puchelle, E. and Casavola, V.** (2004). CIC-2 chloride secretion mediates prostaglandin-induced recovery of barrier function in ischemia-injured porcine ileum. *Gastroenterology* **127**, 802–815.
- Moeser, A. J., Nighot, P. K., Engelke, K. J., Ueno, R. and Blikslager, A. T.** (2007). Recovery of mucosal barrier function in ischemic porcine ileum and colon is stimulated by a novel agonist of the CIC-2 chloride channel, lubiprostone. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **292**,.
- Moghaddam, B. and Adams, R. N.** (1987). Regional differences in resting extracellular potassium levels of rat brain. *Brain Res.* **406**, 337–40.
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J. and Soria, E.** (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J. Mol. Evol.* **60**, 174–82.
- Moore, F. E., Reyon, D., Sander, J. D., Martínez, S. A., Blackburn, J. S., Khayter, C., Ramirez, C. L., Joung, J. K. and Langenau, D. M.** (2012). Improved somatic mutagenesis in zebrafish using transcription activator-like effector nucleases (TALENs). *PLoS One* **7**, e37877.
- Morales, M. M., Nascimento, D. S., Capella, M. A., Lopes, A. G. and Guggino, W. B.** (2001). Arginine vasopressin regulates CFTR and CIC-2 mRNA expression in rat kidney cortex and medulla. *Pflügers Arch.* **443**, 202–211.
- Moreno-Mateos, M. A., Vejnar, C. E., Beaudoin, J.-D., Fernandez, J. P., Mis, E. K., Khokha, M. K. and Giraldez, A. J.** (2015). CRISPRscan: designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting in vivo. *Nat. Methods* **12**, 982–8.
- Moritz, O. L., Tam, B. M., Papermaster, D. S. and Nakayama, T.** (2001). A Functional Rhodopsin-Green Fluorescent Protein Fusion Protein Localizes Correctly in Transgenic *Xenopus laevis* Retinal Rods and Is Expressed in a Time-dependent Pattern. *J. Biol. Chem.* **276**, 28242–51.
- Munsat, T. L.** (1967). Therapy of myotonia. A double-blind evaluation of diphenylhydantoin, procainamide, and placebo. *Neurology* **17**, 359–67.
- Myers, P.** (2008). Synteny: Inferring Ancestral Genomes. *Nat. Educ.* **1**, 47.
- Nagelhus, E. A., Mathiesen, T. M. and Ottersen, O. P.** (2004). Aquaporin-4 in the central nervous system: Cellular and subcellular distribution and coexpression with  $K_{ir4.1}$ . *Neuroscience* **129**, 905–913.
- Nagy, J. I., Dudek, F. E. and Rash, J. E.** (2004). Update on connexins and gap junctions in neurons and glia in the mammalian nervous system. *Brain Res. Rev.* **47**, 191–215.
- Nakajima, S. and Gilai, A.** (1980). Radial propagation of muscle action potential along the

- tubular system examined by potential-sensitive dyes. *J. Gen. Physiol.* **76**, 751–62.
- Nakajima, T., Sugimoto, T. and Kurachi, Y.** (1992). Effects of anions on the G protein-mediated activation of the muscarinic  $K^+$  channel in the cardiac atrial cell membrane. Intracellular chloride inhibition of the GTPase activity of GK. *J. Gen. Physiol.* **99**, 665–82.
- Naruse-Nakajima, C., Asano, M. and Iwakura, Y.** (2001). Involvement of EphA2 in the formation of the tail notochord via interaction with ephrinA1. *Mech. Dev.* **102**, 95–105.
- Nascimento, D. S., Reis, C. U., Goldenberg, R. C., Ortiga-Carvalho, T. M., Pazos-Moura, C. C., Guggino, S. E., Guggino, W. B. and Morales, M. M.** (2003). Estrogen modulates CIC-2 chloride channel gene expression in rat kidney. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* **446**, 593–599.
- Nasevicius, a and Ekker, S. C.** (2000). Effective targeted gene “knockdown” in zebrafish. *Nat. Genet.* **26**, 216–20.
- Neely, J. D., Amiry-Moghaddam, M., Ottersen, O. P., Froehner, S. C., Agre, P. and Adams, M. E.** (2001). Syntrophin-dependent expression and localization of Aquaporin-4 water channel protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 14108–13.
- Nehrke, K., Begenisich, T., Pilato, J. and Melvin, J. E.** (2000). Into ion channel and transporter function. *Caenorhabditis elegans* CIC-type chloride channels: novel variants and functional expression. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **279**, G2052-66.
- Nehrke, K., Arreola, J., Nguyen, H.-V., Pilato, J., Richardson, L., Okunade, G., Baggs, R., Shull, G. E. and Melvin, J. E.** (2002). Loss of hyperpolarization-activated  $Cl^-$  current in salivary acinar cells from *Clcn2* knockout mice. *J. Biol. Chem.* **277**, 23604–11.
- Newman, E. A., Frambach, D. A. and Odette, L. L.** (1984). Control of extracellular potassium levels by retinal glial cell  $K^+$  siphoning. *Science* **225**, 1174–5.
- Neyroud, N., Tesson, F., Denjoy, I., Leibovici, M., Donger, C., Barhanin, J., Fauré, S., Gary, F., Coumel, P., Petit, C., et al.** (1997). A novel mutation in the potassium channel gene KVLQT1 causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome. *Nat. Genet.* **15**, 186–189.
- Nicchia, G. P., Srinivas, M., Li, W., Brosnan, C. F., Frigeri, A. and Spray, D. C.** (2005). New possible roles for aquaporin-4 in astrocytes: cell cytoskeleton and functional relationship with connexin43. *FASEB J.* **19**, 1674–6.
- Niemeyer, M. I., Yusef, Y. R., Cornejo, I., Flores, C. A., Sepúlveda, F. V. and Cid, L. P.** (2004). Functional evaluation of human CIC-2 chloride channel mutations associated with idiopathic generalized epilepsies. *Physiol. Genomics* **19**, 74–83.
- Niemeyer, M. I., Cid, L. P., Yusef, Y. R., Briones, R. and Sepúlveda, F. V.** (2009). Voltage-dependent and -independent titration of specific residues accounts for complex gating of a CIC chloride channel by extracellular protons. *J. Physiol.* **587**, 1387–400.
- Nighot, P. K. and Blikslager, A. T.** (2011). Chloride channel CIC-2 modulates tight junction barrier function via intracellular trafficking of occludin. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **302**,.
- Nighot, P. K., Moeser, A. J., Ryan, K. A., Ghashghaei, T. and Blikslager, A. T.** (2009). CIC-2 is required for rapid restoration of epithelial tight junctions in ischemic-injured murine

- jejunum. *Exp. Cell Res.* **315**, 110–118.
- Novarino, G., Weinert, S., Rickheit, G. and Jentsch, T. J.** (2010). Endosomal Chloride-Proton Exchange Rather Than Chloride Conductance Is Crucial for Renal Endocytosis. *Science* (80-. ). **328**,.
- Obermüller, N., Gretz, N., Kriz, W., Reilly, R. F. and Witzgall, R.** (1998). The swelling-activated chloride channel CIC-2, the chloride channel CIC-3, and CIC-5, a chloride channel mutated in kidney stone disease, are expressed in distinct subpopulations of renal epithelial cells. *J. Clin. Invest.* **101**, 635–642.
- Olsen, M. L., Higashimori, H., Campbell, S. L., Hablitz, J. J. and Sontheimer, H.** (2006). Functional expression of  $K_{ir4.1}$  channels in spinal cord astrocytes. *Glia* **53**, 516–28.
- Orkand, R. K., Nicholls, J. G. and Kuffler, S. W.** (1966). Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J. Neurophysiol.* **29**,.
- Ornellas, D. S., Nascimento, D. S., Christoph, D. H., Guggino, W. B. and Morales, M. M.** (2002). Aldosterone and high-NaCl diet modulate CIC-2 chloride channel gene expression in rat kidney. *Pflügers Arch.* **444**, 193–201.
- Otte, L., Wiedemann, U., Schlegel, B., Pires, J. R., Beyermann, M., Schmieder, P., Krause, G., Volkmer-Engert, R., Schneider-Mergener, J. and Oschkinat, H.** (2003). WW domain sequence activity relationships identified using ligand recognition propensities of 42 WW domains. *Protein Sci.* **12**, 491–500.
- Padilla, S., Hunter, D. L., Padnos, B., Frady, S. and MacPhail, R. C.** (2011). Assessing locomotor activity in larval zebrafish: Influence of extrinsic and intrinsic variables. *Neurotoxicol. Teratol.* **33**, 624–630.
- Palade, P. T. and Barchi, R. L.** (1977). Characteristics of the chloride conductance in muscle fibers of the rat diaphragm. *J. Gen. Physiol.* **69**, 325–42.
- Palczewski, K.** (2006). G protein-coupled receptor rhodopsin. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 743–67.
- Palmér, T., Ek, F., Enqvist, O., Olsson, R., Åström, K. and Petersson, P.** (2017). Action sequencing in the spontaneous swimming behavior of zebrafish larvae - implications for drug development. *Sci. Rep.* **7**, 3191.
- Papponen, H., Kaisto, T., Myllylä, V. V., Myllylä, R. and Metsikkö, K.** (2005). Regulated sarcolemmal localization of the muscle-specific CIC-1 chloride channel. *Exp. Neurol.* **191**, 163–173.
- Park, E., Campbell, E. B. and MacKinnon, R.** (2017). Structure of a CLC chloride ion channel by cryo-electron microscopy. *Nature* **541**, 500–505.
- Parsons, M. J., Pollard, S. M., Saúde, L., Feldman, B., Coutinho, P., Hirst, E. M. A. and Stemple, D. L.** (2002). Zebrafish mutants identify an essential role for laminins in notochord formation. *Development* **129**, 3137–46.
- Patton, E. E. and Zon, L. I.** (2001). The art and design of genetic screens: zebrafish. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 956–66.

- Pederson, B. A., Nordlie, M. A., Foster, J. D. and Nordlie, R. C.** (1998). Effects of Ionic Strength and Chloride Ion on Activities of the Glucose-6-phosphatase System: Regulation of the Biosynthetic Activity of Glucose-6-phosphatase by Chloride Ion Inhibition/Deinhibition. *Arch. Biochem. Biophys.* **353**, 141–151.
- Peng, Y.-J., Huang, J.-J., Wu, H.-H., Hsieh, H.-Y., Wu, C.-Y., Chen, S.-C., Chen, T.-Y. and Tang, C.-Y.** (2016). Regulation of CLC-1 chloride channel biosynthesis by FKBP8 and Hsp90 $\beta$ . *Sci. Rep.* **6**, 32444.
- \* **Pérez-Rius, C., Gaitán-Peñas, H., Estévez, R. and Barrallo-Gimeno, A.** (2014). Identification and characterization of the zebrafish CIC-2 chloride channel orthologs. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **467**, 1769–1781.
- Peterson, R. T., Link, B. A., Dowling, J. E. and Schreiber, S. L.** (2000). Small molecule developmental screens reveal the logic and timing of vertebrate development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 12965–9.
- Petrof, B. J., Shrager, J. B., Stedman, H. H., Kelly, A. M. and Sweeney, H. L.** (1993). Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 3710–4.
- Pfaffl, M. W.** (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45.
- Picollo, A. and Pusch, M.** (2005). Chloride/proton antiporter activity of mammalian CLC proteins CIC-4 and CIC-5. *Nature* **436**, 420–423.
- Picollo, A., Liantonio, A., Babini, E., Camerino, D. C. and Pusch, M.** (2007). Mechanism of Interaction of Niflumic Acid with Heterologously Expressed Kidney CLC-K Chloride Channels. *J. Membr. Biol.* **216**, 73–82.
- Pierno, S., De Luca, A., Tricarico, D., Roselli, A., Natuzzi, F., Ferrannini, E., Laico, M. and Camerino, D. C.** (1995). Potential risk of myopathy by HMG-CoA reductase inhibitors: a comparison of pravastatin and simvastatin effects on membrane electrical properties of rat skeletal muscle fibers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **275**,.
- Pierno, S., Didonna, M. P., Cippone, V., De Luca, A., Pisoni, M., Frigeri, A., Nicchia, G. P., Svelto, M., Chiesa, G., Sirtori, C., et al.** (2006). Effects of chronic treatment with statins and fenofibrate on rat skeletal muscle: a biochemical, histological and electrophysiological study. *Br. J. Pharmacol.* **149**, 909–19.
- Pierno, S., Desaphy, J.-F., Liantonio, A., De Luca, A., Zarrilli, A., Mastrofrancesco, L., Procino, G., Valenti, G. and Conte Camerino, D.** (2007). Disuse of rat muscle in vivo reduces protein kinase C activity controlling the sarcolemma chloride conductance. *J. Physiol.* **584**, 983–95.
- Pietrangelo, A.** (2011). Hepcidin in human iron disorders: Therapeutic implications.
- Plassart-Schiess, E., Gervais, A., Eymard, B., Laguény, A., Pouget, J., Warter, J. M., Fardeau, M., Jentsch, T. J. and Fontaine, B.** (1998). Novel muscle chloride channel (*CLCN1*) mutations in myotonia congenita with various modes of inheritance including incomplete dominance and penetrance. *Neurology* **50**, 1176–9.

- Ponce-Coria, J., San-Cristobal, P., Kahle, K. T., Vazquez, N., Pacheco-Alvarez, D., de Los Heros, P., Juárez, P., Muñoz, E., Michel, G., Bobadilla, N. A., et al.** (2008). Regulation of NKCC2 by a chloride-sensing mechanism involving the WNK3 and SPAK kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 8458–63.
- Postlethwait, J. H., Yan, Y.-L., Gates, M. A., Horne, S., Amores, A., Brownlie, A., Donovan, A., Egan, E. S., Force, A., Gong, Z., et al.** (1998). Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map. *Nat. Genet.* **18**, 345–349.
- Protasi, F., Franzini-Armstrong, C. and Allen, P. D.** (1998). Role of ryanodine receptors in the assembly of calcium release units in skeletal muscle. *J. Cell Biol.* **140**, 831–42.
- Pusch, M., Ludewig, U., Rehfeldt, A. and Jentsch, T. J.** (1995). Gating of the voltage-dependent chloride channel CIC-0 by the permeant anion. *Nature* **373**, 527–531.
- Pusch, M., Liantonio, A., Bertorello, L., Accardi, A., De Luca, A., Pierno, S., Tortorella, V. and Camerino, D. C.** (2000). Pharmacological Characterization of Chloride Channels Belonging to the CIC Family by the Use of Chiral Clofibric Acid Derivatives. *Mol. Pharmacol.* **58**,.
- Qiu, Z., Dubin, A. E., Mathur, J., Tu, B., Reddy, K., Miraglia, L. J., Reinhardt, J., Orth, A. P. and Patapoutian, A.** (2014). SWELL1, a plasma membrane protein, is an essential component of volume-regulated anion channel. *Cell* **157**, 447–58.
- Ransom, D. G., Haffter, P., Odenthal, J., Brownlie, A., Vogelsang, E., Kelsh, R. N., Brand, M., van Eeden, F. J., Furutani-Seiki, M., Granato, M., et al.** (1996). Characterization of zebrafish mutants with defects in embryonic hematopoiesis. *Development* **123**, 311–9.
- Rantala, H., Tarkka, R. and Uhari, M.** (1997). A meta-analytic review of the preventive treatment of recurrences of febrile seizures. *J. Pediatr.* **131**, 922–5.
- Rash, J. E.** (2010). Molecular disruptions of the panglial syncytium block potassium siphoning and axonal saltatory conduction: pertinence to neuromyelitis optica and other demyelinating diseases of the central nervous system. *Neuroscience* **168**, 982–1008.
- Ratté, S. and Prescott, S. A.** (2011). CIC-2 Channels Regulate Neuronal Excitability, Not Intracellular Chloride Levels. *J. Neurosci.* **31**,.
- Ravenscroft, G., Wilmshurst, J. M., Pillay, K., Sivadorai, P., Wallefeld, W., Nowak, K. J. and Laing, N. G.** (2011a). A novel *ACTA1* mutation resulting in a severe congenital myopathy with nemaline bodies, intranuclear rods and type I fibre predominance. *Neuromuscul. Disord.* **21**, 31–36.
- Ravenscroft, G., Jackaman, C., Bringans, S., Papadimitriou, J. M., Griffiths, L. M., McNamara, E., Bakker, A. J., Davies, K. E., Laing, N. G. and Nowak, K. J.** (2011b). Mouse models of dominant *ACTA1* disease recapitulate human disease and provide insight into therapies. *Brain* **134**, 1101–1115.
- Reeves, W. B. and Androli, T. E.** (1992). Renal Epithelial Chloride Channels. *Annu. Rev. Physiol.* **54**, 29–50.
- Reininghaus, J., Füchtbauer, E.-M., Bertram, K. and Jockusch, H.** (1988). The myotonic mouse mutant *ADR*: Physiological and histochemical properties of muscle. *Muscle Nerve*

- 11, 433–439.
- Rhodes, T. H., Vite, C. H., Giger, U., Patterson, D. F., Fahlke, C. and George, A. L.** (1999). A missense mutation in canine CIC-1 causes recessive myotonia congenita in the dog<sup>1</sup>. *FEBS Lett.* **456**, 54–58.
- Riazuddin, S., Anwar, S., Fischer, M., Ahmed, Z. M., Khan, S. Y., Janssen, A. G. H., Zafar, A. U., Scholl, U., Husnain, T., Belyantseva, I. A., et al.** (2009). Molecular Basis of DFNB73: Mutations of *BSND* Can Cause Nonsyndromic Deafness or Bartter Syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **85**, 273–280.
- Ricker, K., Moxley, R. T., Heine, R. and Lehmann-Horn, F.** (1994). Myotonia fluctuans. A third type of muscle sodium channel disease. *Arch. Neurol.* **51**, 1095–102.
- Rickheit, G., Maier, H., Strenzke, N., Andreescu, C. E., De Zeeuw, C. I., Muenscher, A., Zdebik, A. A. and Jentsch, T. J.** (2008). Endocochlear potential depends on Cl<sup>-</sup> channels: mechanism underlying deafness in Bartter syndrome IV. *EMBO J.* **27**, 2907–2917.
- Ridder, M. C., Boor, I., Lodder, J. C., Postma, N. L., Capdevila-Nortes, X., Duarri, A., Brussaard, A. B., Estévez, R., Scheper, G. C., Mansvelder, H. D., et al.** (2011). Megalencephalic leucoencephalopathy with cysts: defect in chloride currents and cell volume regulation. *Brain* **134**, 3342–3354.
- Rios, E. and Brum, G.** (1987). Involvement of dihydropyridine receptors in excitation–contraction coupling in skeletal muscle. *Nature* **325**, 717–720.
- Romanenko, V. G., Nakamoto, T., Catalán, M. A., Gonzalez-Begne, M., Schwartz, G. J., Jaramillo, Y., Sepúlveda, F. V., Figueroa, C. D. and Melvin, J. E.** (2008). *Cln2* encodes the hyperpolarization-activated chloride channel in the ducts of mouse salivary glands. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **295**, G1058-67.
- Rosenbohm, A., Rüdél, R. and Fahlke, C.** (1999). Regulation of the human skeletal muscle chloride channel hCIC-1 by protein kinase C. *J. Physiol.* 677–85.
- Rüdél, R., Ricker, K. and Lehmann-Horn, F.** (1988). Transient weakness and altered membrane characteristic in recessive generalized myotonia (Becker). *Muscle Nerve* **11**, 202–211.
- Russell, W. C., Graham, F. L., Smiley, J. and Nairn, R.** (1977). Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *J. Gen. Virol.* **36**, 59–72.
- Rychkov, G. Y., Pusch, M., Astill, D. S., Roberts, M. L., Jentsch, T. J. and Bretag, A. H.** (1996). Concentration and pH dependence of skeletal muscle chloride channel CIC-1. *J. Physiol.* 423–35.
- Sage, C. L. and Marcus, D. C.** (2001). Immunolocalization of CIC-K chloride channel in strial marginal cells and vestibular dark cells. *Hear. Res.* **160**, 1–9.
- Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., Mullis, K. and Erlich, H.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (80- )*. **239**,
- Saint-Martin, C., Gauvain, G., Teodorescu, G., Gourfinkel-An, I., Fedirko, E., Weber, Y. G.,**

- Maljevic, S., Ernst, J.-P., Garcia-Olivares, J., Fahlke, C., et al.** (2009). Two novel *CLCN2* mutations accelerating chloride channel deactivation are associated with idiopathic generalized epilepsy. *Hum. Mutat.* **30**, 397–405.
- Sander, J. D., Yeh, J. R. J., Peterson, R. T. and Joung, J. K.** (2011). Engineering zinc finger nucleases for targeted mutagenesis of zebrafish. Third Edit. Elsevier Inc.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R.** (1977). Biochemistry DNA sequencing with chain-terminating inhibitors (DNA polymerase/nucleotide sequences/bacteriophage 4X174). **74**, 5463–5467.
- Sasai, Y., Lu, B., Steinbeisser, H., Geissert, D., Gont, L. K. and De Robertis, E. M.** (1994). *Xenopus* chordin: a novel dorsalizing factor activated by organizer-specific homeobox genes. *Cell* **79**, 779–90.
- Savitha, M. R., Krishnamurthy, B., Hyderi, A., Farhan-UI-Haque and Ramachandra, N. B.** (2006). Myotonia congenita--a successful response to carbamazepine. *Indian J. Pediatr.* **73**, 431–3.
- Scheel, O., Zdebik, A. A., Lourdel, S. and Jentsch, T. J.** (2005). Voltage-dependent electrogenic chloride/proton exchange by endosomal CLC proteins. *Nature* **436**, 424–427.
- Scheer, N. and Campos-Ortega, J. A.** (1999). Use of the Gal4-UAS technique for targeted gene expression in the zebrafish. *Mech. Dev.* **80**, 153–8.
- Scheper, G. C., van Berkel, C. G. M., Leisle, L., de Groot, K. E., Errami, A., Jentsch, T. J. and Van der Knaap, M. S.** (2010). Analysis of *CLCN2* as candidate gene for megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Genet. Test. Mol. Biomarkers* **14**, 255–7.
- Schlingmann, K. P., Konrad, M., Jeck, N., Waldegger, P., Reinalter, S. C., Holder, M., Seyberth, H. W. and Waldegger, S.** (2004). Salt Wasting and Deafness Resulting from Mutations in Two Chloride Channels. *N. Engl. J. Med.* **350**, 1314–1319.
- Schmajuk, G., Sierakowska, H. and Kole, R.** (1999). Antisense oligonucleotides with different backbones. Modification of splicing pathways and efficacy of uptake. *J. Biol. Chem.* **274**, 21783–9.
- Schmidt-Rose, T. and Jentsch, T. J.** (1997). Reconstitution of functional voltage-gated chloride channels from complementary fragments of CLC-1. *J. Biol. Chem.* **272**, 20515–21.
- Scholl, U., Hebeisen, S., Janssen, A. G. H., Müller-Newen, G., Alekov, A. and Fahlke, C.** (2006). Barttin modulates trafficking and function of ClC-K channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 11411–6.
- Schriever, A. M., Friedrich, T., Pusch, M. and Jentsch, T. J.** (1999). CLC chloride channels in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* **274**, 34238–44.
- Schulze-Bahr, E., Wang, Q., Wedekind, H., Haverkamp, W., Chen, Q., Sun, Y., Ruble, C., Hördt, M., Towbin, J. A., Borggreffe, M., et al.** (1997). *KCNE1* mutations cause Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Nat. Genet.* **17**, 267–268.
- Schwake, M., Friedrich, T. and Jentsch, T. J.** (2001). An Internalization Signal in ClC-5, an

- Endosomal Cl<sup>-</sup> Channel Mutated in Dent's Disease. *J. Biol. Chem.* **276**, 12049–12054.
- Schwiebert, E. M., Cid-Soto, L. P., Stafford, D., Carter, M., Blaisdell, C. J., Zeitlin, P. L., Guggino, W. B. and Cutting, G. R.** (1998). Analysis of ClC-2 channels as an alternative pathway for chloride conduction in cystic fibrosis airway cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 3879–84.
- Séguret, A., Collignon, B. and Halloy, J.** (2016). Strain differences in the collective behaviour of zebrafish (*Danio rerio*) in heterogeneous environment. *R. Soc. Open Sci.* **3**, 160451.
- Shah, A. N., Davey, C. F., Whitebirch, A. C., Miller, A. C. and Moens, C. B.** (2015). Rapid reverse genetic screening using CRISPR in zebrafish. *Nat. Methods* **12**, 535–540.
- Shmakov, S., Abudayyeh, O. O., Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Gootenberg, J. S., Semenova, E., Minakhin, L., Joung, J., Konermann, S., Severinov, K., et al.** (2015). Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems. *Mol. Cell* **60**, 385–397.
- Simon, D. B., Karet, F. E., Hamdan, J. M., Pietro, A. Di, Sanjad, S. A. and Lifton, R. P.** (1996a). Bartter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na–K–2Cl cotransporter NKCC2. *Nat. Genet.* **13**, 183–188.
- Simon, D. B., Karet, F. E., Rodriguez-Soriano, J., Hamdan, J. H., DiPietro, A., Trachtman, H., Sanjad, S. A. and Lifton, R. P.** (1996b). Genetic heterogeneity of Barter's syndrome revealed by mutations in the K<sup>+</sup> channel, ROMK. *Nat. Genet.* **14**, 152–156.
- Simon, D. B., Bindra, R. S., Mansfield, T. A., Nelson-Williams, C., Mendonca, E., Stone, R., Schurman, S., Nayir, A., Alpay, H., Bakkaloglu, A., et al.** (1997). Mutations in the chloride channel gene, *CLCNKB*, cause Bartter's syndrome type III. *Nat. Genet.* **17**, 171–178.
- \* **Sirisi, S., Folgueira, M., López-Hernández, T., Minieri, L., Pérez-Rius, C., Gaitán-Peñas, H., Zang, J., Martínez, A., Capdevila-Nortes, X., De La Villa, P., et al.** (2014). Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts protein 1 regulates glial surface localization of GLIALCAM from fish to humans. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 5069–5086.
- Sirisi, S., Elorza-Vidal, X., Arnedo, T., Armand-Ugón, M., Callejo, G., Capdevila-Nortes, X., López-Hernández, T., Schulte, U., Barrallo-Gimeno, A., Nunes, V., et al.** (2017). Depolarization causes the formation of a ternary complex between GlialCAM, MLC1 and ClC-2 in astrocytes: implications in megalencephalic leukoencephalopathy. *Hum. Mol. Genet.* **26**, 2436–2450.
- Sík, A., Smith, R. . and Freund, T. .** (2000). Distribution of chloride channel-2-immunoreactive neuronal and astrocytic processes in the hippocampus. *Neuroscience* **101**, 51–65.
- Skálová, D., Zídková, J., Vohánka, S., Mazanec, R., Mušová, Z., Vondráček, P., Mrázová, L., Kraus, J., Réblová, K. and Fajkusová, L.** (2013). *CLCN1* mutations in Czech patients with myotonia congenita, in silico analysis of novel and known mutations in the human dimeric skeletal muscle chloride channel. *PLoS One* **8**, 1–10.
- Skov, M., de Paoli, F. V, Nielsen, O. B. and Pedersen, T. H.** (2016). The anti-convulsants lacosamide, lamotrigine, and rufinamide reduce myotonia in isolated human and rat



- skeletal muscle. *Muscle Nerve*.
- Smith, R., Clayton, G., Wilcox, C., Escudero, K. and Staley, K.** (1995). Differential expression of an inwardly rectifying chloride conductance in rat brain neurons: a potential mechanism for cell-specific modulation of postsynaptic inhibition. *J. Neurosci.* **15**,.
- Solnica-Krezel, L., Schier, A. F. and Driever, W.** (1994). Efficient recovery of ENU-induced mutations from the zebrafish germline. *Genetics* **136**, 1401–20.
- Sonoda, Y., Gotow, T., Kuriyama, M., Nakahara, K., Arimura, K. and Osame, M.** (1994). Electrical myotonia of rabbit skeletal muscles by HMG-CoA reductase inhibitors. *Muscle Nerve* **17**, 891–897.
- Stainier, D. Y., Fouquet, B., Chen, J. N., Warren, K. S., Weinstein, B. M., Meiler, S. E., Mohideen, M. A., Neuhauss, S. C., Solnica-Krezel, L., Schier, A. F., et al.** (1996). Mutations affecting the formation and function of the cardiovascular system in the zebrafish embryo. *Development* **123**, 285–92.
- Staley, K., Smith, R., Schaack, J., Wilcox, C., Jentsch, T. J., Painter, M. . and Mallet, J.** (1996). Alteration of GABAA receptor function following gene transfer of the CLC-2 chloride channel. *Neuron* **17**, 543–51.
- Staub, O., Yeger, H., Plant, P. J., Kim, H., Ernst, S. A. and Rotin, D.** (1997). Immunolocalization of the ubiquitin-protein ligase Nedd4 in tissues expressing the epithelial Na<sup>+</sup> channel (ENaC). *Am. J. Physiol.* **272**, C1871-80.
- Steinmeyer, K., Ortland, C. and Jentsch, T. J.** (1991). Primary structure and functional expression of a developmentally regulated skeletal muscle chloride channel. *Nature* **354**, 301–304.
- Steinmeyer, K., Schwappach, B., Bens, M., Vandewalle, A. and Jentsch, T. J.** (1995). Cloning and functional expression of rat CLC-5, a chloride channel related to kidney disease. *J. Biol. Chem.* **270**, 31172–7.
- Stölting, G., Teodorescu, G., Begemann, B., Schubert, J., Nabbout, R., Toliat, M. R., Sander, T., Nürnberg, P., Lerche, H. and Fahlke, C.** (2013). Regulation of ClC-2 gating by intracellular ATP. *Pflugers Arch.* **465**, 1423–37.
- Streisinger, G., Walker, C., Dower, N., Knauber, D. and Singer, F.** (1981). Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature* **291**, 293–296.
- Stuart, G. W., McMurray, J. V and Westerfield, M.** (1988). Replication, integration and stable germ-line transmission of foreign sequences injected into early zebrafish embryos. *Development* **103**, 403–12.
- Summerton, J.** (1999). Morpholino antisense oligomers: the case for an RNase H-independent structural type. *Biochim. Biophys. Acta* **1489**, 141–58.
- Summerton, J. and Weller, D.** (1997). Morpholino Antisense Oligomers: Design, Preparation, and Properties. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **7**, 187–195.
- Sung, C. H., Makino, C., Baylor, D. and Nathans, J.** (1994). A rhodopsin gene mutation responsible for autosomal dominant retinitis pigmentosa results in a protein that is defective in localization to the photoreceptor outer segment. *J. Neurosci.* **14**, 5818–33.

- Sztal, T. E., Ruparella, A. A., Williams, C. and Bryson-Richardson, R. J.** (2016). Using Touch-evoked Response and Locomotion Assays to Assess Muscle Performance and Function in Zebrafish. *J. Vis. Exp.*
- Tajima, M., Hayama, A., Rai, T., Sasaki, S. and Uchida, S.** (2007). Barttin binds to the outer lateral surface of the ClC-K2 chloride channel. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **362**, 858–64.
- Takamitsu, E., Otsuka, M., Haebara, T., Yano, M., Matsuzaki, K., Kobuchi, H., Moriya, K. and Utsumi, T.** (2015). Identification of Human N-Myristoylated Proteins from Human Complementary DNA Resources by Cell-Free and Cellular Metabolic Labeling Analyses. *PLoS One* **10**, e0136360.
- Takekura, H., Iino, M., Takekura, H., Nishi, M., Kuno, J., Minowa, O., Takano, H. and Noda, T.** (1994). Excitation-contraction uncoupling and muscular degeneration in mice lacking functional skeletal muscle ryanodine-receptor gene. *Nature* **369**, 556–559.
- Tam, B. M., Moritz, O. L., Hurd, L. B. and Papermaster, D. S.** (2000). Identification of an Outer Segment Targeting Signal in the COOH Terminus of Rhodopsin Using Transgenic *Xenopus laevis*. *J. Cell Biol.* **151**, 1369–1380.
- Tanifuji, M., Sokabe, M. and Kasai, M.** (1987). An anion channel of sarcoplasmic reticulum incorporated into planar lipid bilayers: single-channel behavior and conductance properties. *J. Membr. Biol.* **99**, 103–11.
- Telfer, W. R., Busta, A. S., Bonnemant, C. G., Feldman, E. L. and Dowling, J. J.** (2010). Zebrafish models of collagen VI-related myopathies. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 2433–44.
- Tewari, K. P., Malinowska, D. H., Sherry, A. M. and Cuppoletti, J.** (2000). PKA and arachidonic acid activation of human recombinant ClC-2 chloride channels. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **279**,.
- Thanh, T. N., Chiron, C., Dellatolas, G., Rey, E., Pons, G., Vincent, J. and Dulac, O.** (2002). Long-term efficacy and tolerance of stiripentaol in severe myoclonic epilepsy of infancy (Dravet's syndrome). *Arch. Pediatr.* **9**, 1120–7.
- Thiemann, A., Gründer, S., Pusch, M. and Jentsch, T. J.** (1992). A chloride channel widely expressed in epithelial and non-epithelial cells. *Nature* **356**, 57–60.
- Thompson, C. H., Fields, D. M., Olivetti, P. R., Fuller, M. D., Zhang, Z. R., Kubanek, J. and McCarty, N. A.** (2005). Inhibition of ClC-2 Chloride Channels by a Peptide Component or Components of Scorpion Venom. *J. Membr. Biol.* **208**, 65–76.
- Thompson, C. H., Olivetti, P. R., Fuller, M. D., Freeman, C. S., McMaster, D., French, R. J., Pohl, J., Kubanek, J. and McCarty, N. A.** (2009). Isolation and characterization of a high affinity peptide inhibitor of ClC-2 chloride channels. *J. Biol. Chem.* **284**, 26051–62.
- Thomsen, J.** (1876). Tonische Krämpfe in willkürlich beweglichen Muskeln in Folge von erbter psychischer Disposition. *Arch. Psychiatr. Nervenkr.* **6**, 702–718.
- Thomson, G. W.** (1956). Quinidine as a Cause of Sudden Death. *Circulation* **14**,.
- Tingaud-Sequeira, A., Calusinska, M., Finn, R. N., Chauvigné, F., Lozano, J. and Cerdà, J.** (2010). The zebrafish genome encodes the largest vertebrate repertoire of functional

- aquaporins with dual paralogy and substrate specificities similar to mammals. *BMC Evol. Biol.* **10**, 38.
- Trimble, W. S., Cowan, D. M. and Scheller, R. H.** (1988). VAMP-1: a synaptic vesicle-associated integral membrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 4538–42.
- Trimmer, J. S., Cooperman, S. S., Tomiko, S. A., Zhou, J. Y., Crean, S. M., Boyle, M. B., Kallen, R. G., Sheng, Z. H., Barchi, R. L., Sigworth, F. J., et al.** (1989). Primary structure and functional expression of a mammalian skeletal muscle sodium channel. *Neuron* **3**, 33–49.
- Tsai, S. Q. and Joung, K. J.** (2016). Defining and improving the genome-wide specificities of CRISPR-Cas9 nucleases. *Nat Rev Genet* **17**, 300–312.
- Uchida, S., Sasaki, S., Furukawa, T., Hiraoka, M., Imai, T., Hirata, Y. and Marumo, F.** (1993). Molecular cloning of a chloride channel that is regulated by dehydration and expressed predominantly in kidney medulla. *J. Biol. Chem.* **268**, 3821–4.
- Uchida, S., Sasaki, S., Nitta, K., Uchida, K., Horita, S., Nihei, H. and Marumo, F.** (1995). Localization and functional characterization of rat kidney-specific chloride channel, CIC-K1. *J. Clin. Invest.* **95**, 104–113.
- van den Bos, R., Mes, W., Galligani, P., Heil, A., Zethof, J., Flik, G. and Gorissen, M.** (2017). Further characterisation of differences between TL and AB zebrafish (*Danio rerio*): Gene expression, physiology and behaviour at day 5 of the larval stage. *PLoS One* **12**, e0175420.
- van der Knaap, M. S., Barth, P. G., Stroink, H., van Nieuwenhuizen, O., Arts, W. F. M., Hoogenraad, F. and Valk, J.** (1995). Leukoencephalopathy with swelling and a discrepantly mild clinical course in eight children. *Ann. Neurol.* **37**, 324–334.
- van der Oost, J., Jore, M. M., Westra, E. R., Lundgren, M. and Brouns, S. J. J.** (2009). CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes. *Trends Biochem. Sci.* **34**, 401–407.
- Vandewalle, A., Cluzeaud, F., Bens, M., Kieferle, S., Steinmeyer, K. and Jentsch, T. J.** (1997). Localization and induction by dehydration of CIC-K chloride channels in the rat kidney. *Am. J. Physiol.* **272**, F678–88.
- VanGuilder, H., Vrana, K. and Freeman, W.** (2008). Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques* 619–626.
- Varshney, G. K., Zhang, S., Pei, W., Adomako-Ankomah, A., Fohitung, J., Schaffer, K., Carrington, B., Maskeri, A., Slevin, C., Wolfsberg, T., et al.** (2016). CRISPRz: A database of zebrafish validated sgRNAs. *Nucleic Acids Res.* **44**, D822–D826.
- Voss, F. K., Ullrich, F., Münch, J., Lazarow, K., Lutter, D., Mah, N., Andrade-Navarro, M. A., von Kries, J. P., Stauber, T. and Jentsch, T. J.** (2014). Identification of LRRC8 Heteromers as an Essential Component of the Volume-Regulated Anion Channel VRAC. *Science (80- )*. **344**,.
- Wakeman, B., Babu, D., Tarleton, J., MacDonald, I. M., Kodjikian, L., Grange, J. D. and al., et** (2008). Extraocular muscle hypertrophy in myotonia congenita. *J. Am. Assoc. Pediatr.*

- Ophthalmol. Strabismus* **12**, 294–296.
- Waldegger, S. and Jentsch, T. J.** (2000). Functional and structural analysis of ClC-K chloride channels involved in renal disease. *J. Biol. Chem.* **275**, 24527–33.
- Waldegger, S., Jeck, N., Barth, P., Peters, M., Vitzthum, H., Wolf, K., Kurtz, A., Konrad, M. and Seyberth, H. W.** (2002). Barttin increases surface expression and changes current properties of ClC-K channels. *Pflugers Arch.* **444**, 411–8.
- Walz, W.** (2002). Chloride/anion channels in glial cell membranes. *Glia* **40**, 1–10.
- Wang, Y., Schnegelsberg, P. N. J., Dausman, J. and Jaenisch, R.** (1996). Functional redundancy of the muscle-specific transcription factors Myf5 and myogenin. *Nature* **379**, 823–825.
- Wang, Y.-F., Tseng, Y.-C., Yan, J.-J., Hiroi, J. and Hwang, P.-P.** (2009). Role of SLC12A10.2, a Na-Cl cotransporter-like protein, in a Cl<sup>-</sup> uptake mechanism in zebrafish (*Danio rerio*). *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **296**,.
- Waters, C. W., Varuzhanyan, G., Talmadge, R. J. and Voss, A. A.** (2013). Huntington disease skeletal muscle is hyperexcitable owing to chloride and potassium channel dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 9160–5.
- Waugh, T. A., Horstick, E., Hur, J., Jackson, S. W., Davidson, A. E., Li, X. and Dowling, J. J.** (2014). Fluoxetine prevents dystrophic changes in a zebrafish model of duchenne muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 4651–4662.
- Weinert, S., Jabs, S., Supanchart, C., Schweizer, M., Gimber, N., Richter, M., Rademann, J., Stauber, T., Kornak, U. and Jentsch, T. J.** (2010). Lysosomal Pathology and Osteopetrosis upon Loss of H<sup>+</sup>-Driven Lysosomal Cl<sup>-</sup> Accumulation. *Science (80- )*. **328**,.
- Wells, S. E., Hillner, P. E., Vale, R. D. and Sachs, A. B.** (1998). Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol. Cell* **2**, 135–40.
- White, M. M. and Miller, C.** (1979). A Voltage-gated Anion Channel from the Electric Organ of *Torpedo californica*. *J. Biol. Chem.* **254**, 10161–10166.
- Whittaker, J. R.** (1966). An analysis of melanogenesis in differentiating pigment cells of ascidian embryos. *Dev. Biol.* **14**, 1–39.
- Widrick, J. J., Alexander, M., Sanchez, B., Gibbs, D., Kawahara, G., Beggs, A. and Kunkel, L.** (2016). Muscle dysfunction in a zebrafish model of Duchenne muscular dystrophy. *Physiol. Genomics* [physiolgenomics.00088.2016](https://doi.org/10.1159/000440088).
- Wiens, K. M., Lee, H. L., Shimada, H., Metcalf, A. E., Chao, M. Y. and Lien, C.-L.** (2010). Platelet-Derived Growth Factor Receptor  $\beta$  Is Critical for Zebrafish Intersegmental Vessel Formation. *PLoS One* **5**, e11324.
- Wingert, R. A. and Davidson, A. J.** (2008). The zebrafish pronephros: A model to study nephron segmentation. *Kidney Int.* **73**, 1120–1127.
- Wittwer, C. T., Reed, G. H., Gundry, C. N., Vandersteens, J. G. and Pryor, R. J.** (2003). High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin. Chem.* **49**, 853–60.
- Wolf, K., Meier-Meitingner, M., Bergler, T., Castrop, H., Vitzthum, H., Riegger, G. A. J.,**

- Kurtz, A. and Krämer, B. K.** (2003). Parallel down-regulation of chloride channel CLC-K1 and barttin mRNA in the thin ascending limb of the rat nephron by furosemide. *Pflugers Arch.* **446**, 665–71.
- Wu, F.-F., Ryan, A., Devaney, J., Warnstedt, M., Korade-Mirnic, Z., Poser, B., Escriva, M. J., Pegoraro, E., Yee, A. S., Felice, K. J., et al.** (2002). Novel *CLCN1* mutations with unique clinical and electrophysiological consequences. *Brain* **125**, 2392–407.
- Xiao, A., Wang, Z., Hu, Y., Wu, Y., Luo, Z., Yang, Z., Zu, Y., Li, W., Huang, P., Tong, X., et al.** (2013). Chromosomal deletions and inversions mediated by TALENs and CRISPR/Cas in zebrafish. *Nucleic Acids Res.* **41**, e141–e141.
- Yamada, T. and Strange, K.** (2016). Regulatory Conformational Coupling between CLC Anion Channel Membrane and Cytoplasmic Domains. *Biophys. J.* **111**, 1887–1896.
- Yamada, T., Krzeminski, M., Bozoky, Z., Forman-Kay, J. D. and Strange, K.** (2016). Role of CBS and Bateman Domains in Phosphorylation-Dependent Regulation of a CLC Anion Channel. *Biophys. J.* **111**, 1876–1886.
- Yang, X.-Y., Lai, X.-G., Zhang, Y., Pei, J.-M., Yang, A.-G. and Zhou, S.-S.** (2006). siRNA-mediated silencing of *CIC-2* gene inhibits proliferation of human U-87 glioma cells. *Ai Zheng* **25**, 805–10.
- Yankaskas, J. R., Marshall, B. C., Sufian, B., Simon, R. H. and Rodman, D.** (2004). Cystic Fibrosis Adult Care: Consensus Conference Report. *Chest* **125**, 1S–39S.
- Yu, Y., Xu, C., Pan, X., Ren, H., Wang, W., Meng, X., Huang, F. and Chen, N.** (2010). Identification and functional analysis of novel mutations of the *CLCNKB* gene in Chinese patients with classic Bartter syndrome. *Clin. Genet.* **77**, 155–162.
- Zdebik, A. A., Cuffe, J. E., Bertog, M., Korbmacher, C. and Jentsch, T. J.** (2004). Additional disruption of the *CIC-2* Cl<sup>-</sup> channel does not exacerbate the cystic fibrosis phenotype of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mouse models. *J. Biol. Chem.* **279**, 22276–83.
- Zdebik, A. A., Zifarelli, G., Bergsdorf, E.-Y., Soliani, P., Scheel, O., Jentsch, T. J. and Pusch, M.** (2008). Determinants of anion-proton coupling in mammalian endosomal CLC proteins. *J. Biol. Chem.* **283**, 4219–27.
- Zeddies, D. G. and Fay, R. R.** (2005). Development of the acoustically evoked behavioral response in zebrafish to pure tones. *J. Exp. Biol.* **208**,.
- Zetsche, B., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Slaymaker, I. M., Makarova, K. S., Essletzbichler, P., Volz, S. E., Joung, J., van der Oost, J., Regev, A., et al.** (2015). Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System. *Cell* **163**, 759–771.
- Zhang, H. and Verkman, A. S.** (2008). Aquaporin-4 independent  $K_{ir4.1}$  K<sup>+</sup> channel function in brain glial cells. *Mol. Cell. Neurosci.* **37**, 1–10.
- Zhang, Z., Zhang, F., An, P., Guo, X., Shen, Y., Tao, Y., Wu, Q., Zhang, Y., Yu, Y., Ning, B., et al.** (2011). Ferroportin1 deficiency in mouse macrophages impairs iron homeostasis and inflammatory responses. *Blood* **118**,.

- Zifarelli, G., Liantonio, A., Gradogna, A., Picollo, A., Gramegna, G., De Bellis, M., Murgia, A., Babini, E., Conte Camerino, D. and Pusch, M. (2010). Identification of sites responsible for the potentiating effect of niflumic acid on CIC-Ka kidney chloride channels. *Br. J. Pharmacol.* **160**, 1652–1661.
- Zon, L. I., Donovan, A., Brownlie, A., Zhou, Y., Shepard, J., Pratt, S. J., Moynihan, J., Paw, B. H., Drejer, A., Barut, B., et al. (2000). Positional cloning of zebrafish *ferroportin1* identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* **403**, 776–781.
- Zu, Y., Tong, X., Wang, Z., Liu, D., Pan, R., Li, Z., Hu, Y., Luo, Z., Huang, P., Wu, Q., et al. (2013). TALEN-mediated precise genome modification by homologous recombination in zebrafish. *Nat. Methods* **10**, 329–331.
- Zucconi, E., Valadares, M. C., Vieira, N. M., Bueno, C. R., Secco, M., Jazedje, T., Almeida da Silva, H. C., Vainzof, M. and Zatz, M. (2010). Ringo: Discordance between the molecular and clinical manifestation in a Golden Retriever Muscular Dystrophy dog. *Neuromuscul. Disord.* **20**, 64–70.
- Zúñiga, L., Niemeyer, M. I., Varela, D., Catalán, M., Cid, L. P. and Sepúlveda, F. V (2004). The voltage-dependent CIC-2 chloride channel has a dual gating mechanism. *J. Physiol.* **555**, 671–82.



# PUBLICACIONES

## Articles publicats

Sirisi, S., Folgueira, M., López-Hernández, T., Minieri, L., **Pérez-Rius, C.**, Gaitán-Peñas, H., Zang, J., Martínez, A., Capdevila-Nortes, X., De La Villa, P., et al. (2014). Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts protein 1 regulates glial surface localization of GLIALCAM from fish to humans. *Hum. Mol. Genet.* 23, 5069–5086.

**Pérez-Rius, C.**, Gaitán-Peñas, H., Estévez, R. and Barrallo-Gimeno, A. (2014). Identification and characterization of the zebrafish CIC-2 chloride channel orthologs. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 467, 1769–1781.

## Articles enviats

Estévez, R., Elorza-Vidal, X., Gaitán-Peñas, H., **Pérez-Rius, C.**, Armand-Ugón, M., Alonso-Gardón, M., Xicoy-Espauella, E., Sirisi, S., Arnedo, T., Capdevila-Nortes, X., López-Hernández, T., Montolio, M., Duarri, A., Teijido, O., Barrallo-Gimeno, A., Palacín, M. and Nunes, V. (2017). Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: a personal biochemical retrospective. Enviat a European Journal of Medical Genetics.





# Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts protein 1 regulates glial surface localization of GLIALCAM from fish to humans

Sònia Sirisi<sup>1,4,†</sup>, Mónica Folgueira<sup>5,†</sup>, Tania López-Hernández<sup>1</sup>, Laura Minieri<sup>6</sup>, Carla Pérez-Rius<sup>1</sup>, Héctor Gaitán-Peñas<sup>1</sup>, Jingjing Zang<sup>7</sup>, Albert Martínez<sup>2</sup>, Xavier Capdevila-Nortes<sup>1</sup>, Pedro De La Villa<sup>8</sup>, Upasana Roy<sup>9,10</sup>, A. Alia<sup>9,10</sup>, Stephan Neuhaus<sup>7</sup>, Stefano Ferroni<sup>6</sup>, Virginia Nunes<sup>3,4,11</sup>, Raúl Estévez<sup>1,12,‡,\*</sup> and Alejandro Barrallo-Gimeno<sup>1,12,‡,\*</sup>

<sup>1</sup>Sección de Fisiología, Departamento de Ciencias Fisiológicas II, <sup>2</sup>Department of Cell Biology and <sup>3</sup>Sección de Genética, Departamento de Ciencias Fisiológicas II, Universidad de Barcelona, Barcelona, Spain <sup>4</sup>Laboratorio de Genética Molecular-IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, Spain <sup>5</sup>Department of Cell & Molecular Biology, University of A Coruña, A Coruña, Spain <sup>6</sup>Department of Pharmacy and Biotechnology, University of Bologna, Bologna, Italy <sup>7</sup>Institute of Molecular Life Sciences, University of Zurich, Zurich, Switzerland <sup>8</sup>Department of Systems Biology, University of Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, Spain <sup>9</sup>Leiden Institute of Chemistry, Leiden University, Leiden, The Netherlands <sup>10</sup>Institute of Medical Physics and Biophysics, University of Leipzig, Leipzig, Germany <sup>11</sup>U-730 and <sup>12</sup>U-750, Centro de Investigación en red de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, Barcelona, Spain

Received March 19, 2014; Revised and Accepted May 8, 2014

**Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (MLC) is a leukodystrophy characterized by myelin vacuolization and caused by mutations in *MLC1* or *GLIALCAM*. Patients with recessive mutations in either *MLC1* or *GLIALCAM* show the same clinical phenotype. It has been shown that *GLIALCAM* is necessary for the correct targeting of *MLC1* to the membrane at cell junctions, but its own localization was independent of *MLC1* *in vitro*. However, recent studies in *Mlc1*<sup>-/-</sup> mice have shown that *GlialCAM* is mislocalized in glial cells. In order to investigate whether the relationship between *Mlc1* and *GlialCAM* is species-specific, we first identified MLC-related genes in zebrafish and generated an *mlc1*<sup>-/-</sup> zebrafish. We have characterized *mlc1*<sup>-/-</sup> zebrafish both functionally and histologically and compared the phenotype with that of the *Mlc1*<sup>-/-</sup> mice. In *mlc1*<sup>-/-</sup> zebrafish, as in *Mlc1*<sup>-/-</sup> mice, *Glialcam* is mislocalized. Re-examination of a brain biopsy from an MLC patient indicates that *GLIALCAM* is also mislocalized in Bergmann glia in the cerebellum. *In vitro*, impaired localization of *GlialCAM* was observed in astrocyte cultures from *Mlc1*<sup>-/-</sup> mouse only in the presence of elevated potassium levels, which mimics neuronal activity. In summary, here we demonstrate an evolutionary conserved role for *MLC1* in regulating glial surface levels of *GLIALCAM*, and this interrelationship explains why patients with mutations in either gene (*MLC1* or *GLIALCAM*) share the same clinical phenotype.**

## INTRODUCTION

Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (MLC) is a rare type of congenital leukodystrophy characterized

mainly by myelin vacuolization and early onset of macrocephaly (1). Magnetic resonance imaging (MRI) of patient's brains shows diffuse signal abnormality, and this method is used for diagnosis during childhood (2). MLC is caused by mutations

\*To whom correspondence should be addressed at: Facultat de Medicina, Departament de Ciències Fisiològiques II, Universitat de Barcelona, C/Feixa Llarga s/n 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain. Tel: +34 934039781; Fax: +34 934024268; Email: restévez@ub.edu (R.E.); abarra llo@ub.edu (A.B.-G.)

<sup>†</sup>These authors contributed equally.

<sup>‡</sup>These authors share last authorship.

in either *MLC1* (MIM #605908) or *GLIALCAM* (MIM #611642) genes (3,4).

*MLC1* encodes for a membrane protein, which is expressed in several brain barriers, mainly in ependymal cells, astrocytes surrounding blood vessels and Bergmann radial glia in the cerebellum. In all cells, *MLC1* is localized at cell junctions (5–7). Surprisingly, *MLC1* is not expressed in oligodendrocytes, the site of the primary pathology of MLC (8). Mutations have been found across the whole coding sequence (3,9–11), which cause protein folding defects that lead to degradation of *MLC1* (12,13). The function of *MLC1* is still unknown, although it has been related to the activation of volume-regulated anion currents (VRAC) (14,15), involved in cellular osmotic response. It has been indicated that a reduced VRAC activity may lead to intracellular water accumulation and to the vacuolization observed in patients (15,16). In addition, other studies have suggested that *MLC1* cooperates with the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase and the TRPV4 channel (17,18), although the exact mechanism is still unknown.

GlialCAM (also called HEPACAM due to its original discovery in hepatic cancer cells) is a cell adhesion molecule of the immunoglobulin family (19) that is mostly expressed in glial cells (20) and co-localizes with *MLC1* at astrocyte–astrocyte junctions (4). MLC patients with recessive mutations in *GLIALCAM* (known as MLC2A type of MLC, MIM #613925) present the same phenotype as patients carrying recessive mutations in *MLC1* (MLC1 type of MLC, MIM #604004) (4,21). Some MLC patients have dominant mutations in the *GLIALCAM* gene (MLC2B type of MLC, MIM #613926), and these are associated to various degrees of phenotypic expression, ranging from a transient benign form of MLC, to macrocephaly and mental retardation with or without autism (4,21).

Both data obtained from *in vitro* and from *GlialCAM*<sup>-/-</sup> mice have demonstrated that GlialCAM is necessary for *MLC1* to exit the endoplasmatic reticulum and target cell junctions (13,15,22). Furthermore, a mistargeting of both GlialCAM and *MLC1* to cell junctions has been shown by *in vitro* studies with most missense *GLIALCAM* mutations (either recessive or dominant) and with *GlialCAM*<sup>dn/dn</sup> knock-in mice harbouring a dominant mutation (4,13,22,23). In contrast, GlialCAM seems to be able to traffic to cell junctions by itself (13,19). Thus, the overlapping phenotype of *MLC1* and MLC2A patients can be understood because of the cardinal role of *MLC1* in the pathogenesis of MLC.

However, GlialCAM, but not *MLC1*, is detected in oligodendrocytes (4,20); it was also found that GlialCAM functions as an auxiliary glial-specific subunit of the broadly expressed CIC-2 chloride channel (24). Furthermore, MLC-related *GLIALCAM* mutations impair the trafficking of CIC-2 to cell junctions (23,24). Analyses of *GlialCAM*<sup>-/-</sup> and *GlialCAM*<sup>dn/dn</sup> knock-in mice have shown that localization of CIC-2 in glial junctions is dependent on GlialCAM (22). Thus, based on these *in vitro* and *in vivo* data, patients carrying recessive *GLIALCAM* mutations should be more severely affected than patients carrying recessive *MLC1* mutations, as CIC-2 channel may also be affected in those carrying *GLIALCAM* mutations. However, there are no clinical differences between these two types of patients.

Recent studies with *Mlc1*<sup>-/-</sup> mice have shown that, contrary to what was expected based on the lack of direct interaction between *MLC1* and CIC-2, GlialCAM and CIC-2 are mislocalized in astrocytes and oligodendrocytes when *MLC1* is absent

(22). Based on cell culture data, it was indicated that *MLC1* and CIC-2 could indirectly interact through homotypic extracellular GlialCAM-mediated interactions (22), as previously suggested (25). These results indicate that lack of function of CIC-2 may be involved in the pathogenesis of MLC (22). Lack of CIC-2 function has also been associated with a distinct form of leukoencephalopathy (26).

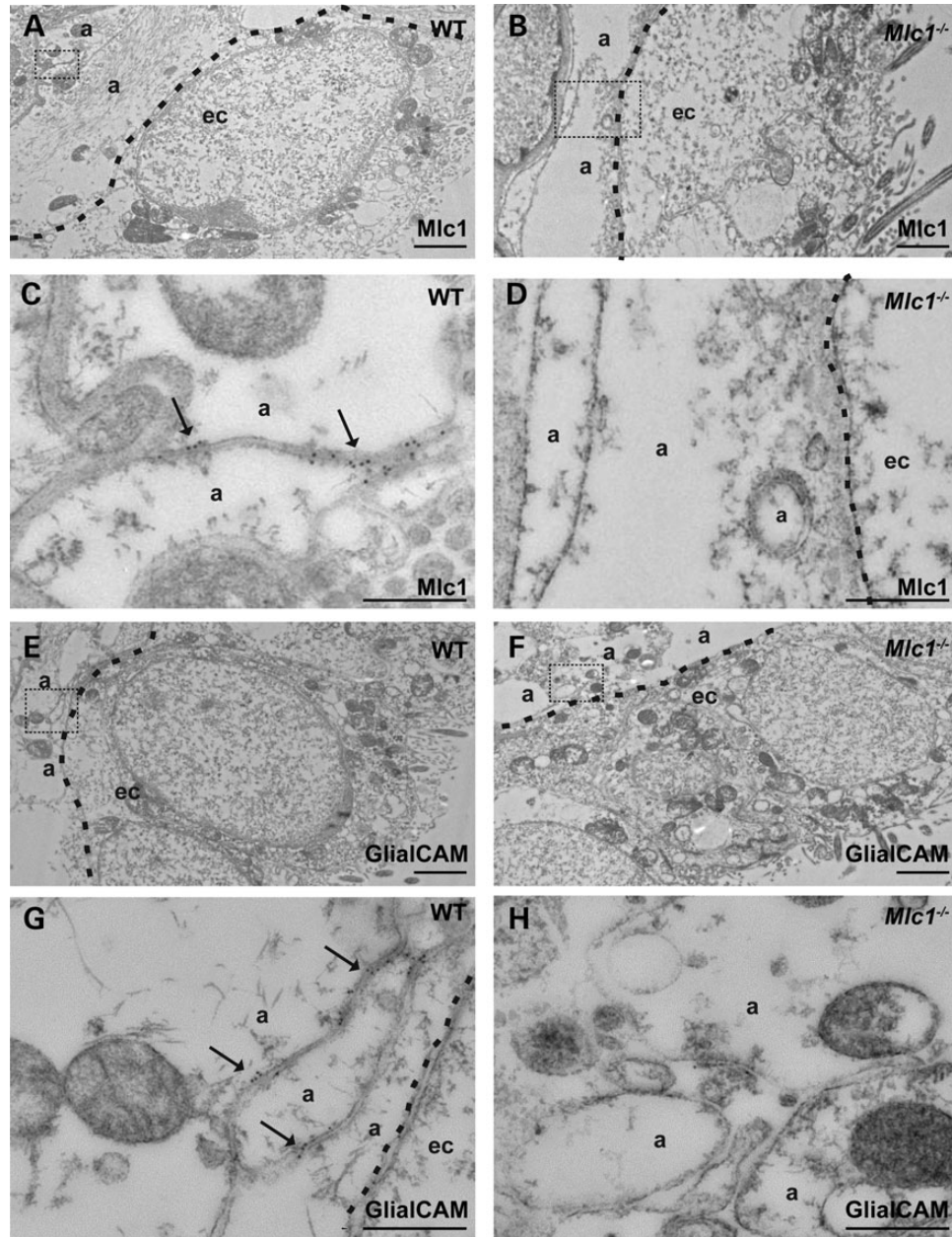
The mislocalization of GlialCAM found in *Mlc1*<sup>-/-</sup> mice contradicts previous results obtained using RNA interference of *Mlc1* in rat astrocytes and localization studies of GLIALCAM around blood vessels in a sample from an *MLC1* patient (13). Although RNA interference may not completely reproduce the gene knockout phenotype, we have previously shown that *Mlc1* RNAi induces a significant decrease in *Mlc1* protein levels (12,13). Thus, it is unclear if GlialCAM is unstable without *MLC1* only in mice, or whether this is a general mechanism.

To solve this controversy, we decided to examine the relationship between *Mlc1* and GlialCAM in other animal species. We generated a zebrafish model for MLC based on the lack of *mlc1*. As in mice, characterization of the zebrafish model revealed that loss of *mlc1* impairs the correct localization of *glialcam*. Re-examination of the brain biopsy from a *MLC1* patient that had been previously studied revealed that GlialCAM was mislocalized in Bergmann glia. These results confirm that the *MLC1*-dependent localization of GlialCAM is a general mechanism, as data from *Mlc1*<sup>-/-</sup> mouse had shown. As in the RNA interference experiments, cultured astrocytes from *Mlc1*<sup>-/-</sup> mice show normal GlialCAM localization, but slightly reduced VRAC activity. However, we observed that mimicking neuronal activity in *Mlc1*<sup>-/-</sup> astrocyte cultures causes GlialCAM mislocalization. Hence, data presented here explain previous discrepancies and reveal a conserved activity-regulated role of *MLC1* in determining the localization of GLIALCAM.

## RESULTS

### GlialCAM is also mislocalized in *Mlc1*<sup>-/-</sup> astrocytes close to ependymal cells

*In situ* hybridization and immunohistochemistry studies have demonstrated that *MLC1* and GLIALCAM co-localize in astrocytes close to brain barriers, Bergmann glia and ependymal cells, and that GLIALCAM is additionally expressed in oligodendrocytes (4,6,7,20). In *Mlc1*<sup>-/-</sup> mice, GlialCAM is mislocalized in astrocytes, Bergmann glia and oligodendrocytes (22). We examined whether GlialCAM was also mislocalized in ependymal cells by means of electron microscopy. To our surprise, gold particle-labelled antibodies showed that *Mlc1* is not present in ependymal cells, but rather in astrocyte–astrocyte contacts below ependymal cells (Fig. 1A and C). Control experiments in *Mlc1*<sup>-/-</sup> mice confirmed the specificity of the signal (Fig. 1B and D). GlialCAM co-localized with *Mlc1* in subependymal astrocyte–astrocyte contacts (Fig. 1E and G), and, as observed previously in astrocytes and oligodendrocytes, GlialCAM was also mislocalized in astrocytes near ependymal cells in *Mlc1*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 1F and H). Thus, we conclude that the absence of *Mlc1* in mice causes mistargeting of GlialCAM in all types of glial cells.



**Figure 1.** GlialCAM does not localize to astrocyte junctions in subependymal astrocytes in *Mlc1*<sup>-/-</sup> mice. (A–D) EM immunolabelling of ependymal cells shows localization of Mlc1 in astrocyte–astrocyte junctions (arrows) near ependymal cells (A and C). Dotted lines highlight boundaries between ependymal cells (ec) and inner astrocytic processes (a). The signal was specific as it was absent in *Mlc1*<sup>-/-</sup> mice (B and D). The insets in (A) and (B) are shown amplified in (C) and (D). Scale bars: (A, B): 2  $\mu$ m; (C, D): 500 nm. (E–H) EM immunolabelling images of GlialCAM in astrocyte junctions below ependymal cells (arrows) (E, G). GlialCAM protein could not be observed in astrocyte–astrocyte junctions in *Mlc1*<sup>-/-</sup> mice (F, H). The insets in (E) and (F) are shown amplified in (G) and (H). Scale bars: (E and F): 2  $\mu$ m; (G and H): 500 nm.

### Identification of MLC-related genes in zebrafish

To address whether this Mlc1-dependent mislocalization of GlialCAM was a conserved feature, we decided to generate an *Mlc1*-deficient animal model in another species. By means of sequence database inspection, we found that genes encoding the orthologue of human *MLC1* are present in all vertebrates, including zebrafish (*Danio rerio*), that has a single orthologue (Supplementary Material, Fig. S1A). In contrast, metazoan model organisms, such as *Drosophila melanogaster* and

*Caenorhabditis elegans*, which lack myelin, do not possess *MLC1* orthologues (3). For *GLIALCAM*, we observed that the teleost-specific genome duplication yielded two *glialcam* paralogues: *glialcam* and *glialcamb* (Supplementary Material, Fig. S2A).

Sequence comparison between zebrafish *mlc1* and its human orthologue showed an overall 53% identity that was higher (63%) at the putative transmembrane domains and the terminal part of the C-terminus (Supplementary Material, Fig. S1B). Both *glialcam* paralogues showed a 76% identity with human

GLIALCAM across the two extracellular Ig-domains and the putative transmembrane domain, but the conservation of the C-terminal intracellular domain was very low, saved for a stretch of residues in the central part (Supplementary Material, Fig. S2B).

We cloned zebrafish *mlc1* and both *glialcam* paralogues, fused to an intracellular FLAG tag, and expressed them transiently in HeLa cells. Importantly, *glialcam* could be predominantly detected in cell junctions (Fig. 2A), while *glialcamb* was found in a diffuse manner (Fig. 2B). Like its human counterpart (13), *glialcam* was able to target zebrafish *mlc1* (Fig. 2C–E) and rat chloride channel CIC-2 (24) (Fig. 2F–H) to cell junctions. Furthermore, *glialcam* and not *glialcamb* was able to modify the functional properties of rat CIC-2-mediated currents in *Xenopus* oocytes. *Glialcam*, as with the human ortholog (24), not only increased CIC-2-mediated currents, but also changed rectification and activation properties (Fig. 2I–L). To additionally verify that *glialcam* behaves as human GLIALCAM, we analysed *glialcam* variants containing MLC-related mutations in conserved residues (Supplementary Material, Fig. S2B) that have previously shown trafficking defects (13). As happened in human GLIALCAM (4), we observed that the introduction of MLC-related mutations in *glialcam* negatively affected its junctional localization without substantially interfering with its expression levels (Supplementary Material, Fig. S3A–C).

These results suggest that zebrafish *glialcam*, and not *glialcamb*, could perform the same physiological functions as human GLIALCAM. Therefore, we decided to focus our studies on this zebrafish paralogue.

### Generation of a mutant *mlc1* zebrafish line

We generated a zebrafish *mlc1* knockout line by sequencing the first exons of the *mlc1* gene on the ENU-based TILLING library at the laboratory of Dr C. Moens at the FHCRC (Seattle, USA). Unfortunately, we did not detect any stop, frameshift or splice site mutations that would potentially abolish normal protein expression. However, we detected a missense mutation (c.241T>G) in one allele (*mlc1*<sup>fh328</sup>), resulting in the substitution of a conserved hydrophobic residue (isoleucine) for a charged one (arginine; p.81I>R) on the predicted first transmembrane domain of the protein. We hypothesized that the introduction of a positive charge in the transmembrane domain could be deleterious for its protein expression. In order to test this, we introduced the equivalent mutation (V64R, Supplementary Material, Fig. S1B) in human MLC1 carrying HA epitope tags (one at the N-terminus and the other extracellular) and assayed surface expression by an ELISA-based luminescence assay in *Xenopus* oocytes (Fig. 3A). We used oocytes because their incubation temperature (18°C) would reveal whether the mutation causes folding defects (27). No surface expression could be detected, confirming our hypothesis that the mutation was deleterious.

Therefore, the heterozygous founder zebrafish were pair-wise mated and out-crossed for several generations to eliminate any other background mutations from the original ENU mutagenesis (see Materials and Methods). As the mutation results in a novel *DdeI* restriction site, it was possible to perform RFLP genotyping, and gene sequencing confirmed the presence of the mutation (Fig. 3B and C). As our previous antibodies against human or

mouse Mlc1 proteins did not recognize the zebrafish orthologue (data not shown), we developed a new rabbit polyclonal antibody that was able to detect zebrafish *mlc1* (Fig. 3D and E). We assayed *mlc1* expression in brain extracts from wild-type, heterozygous and homozygous *mlc1*<sup>fh328</sup> adult fish siblings. No *mlc1* protein expression could be detected in homozygotes, validating the allele *mlc1*<sup>fh328</sup> as an *mlc1* knockout line, which we will refer to as *mlc1*<sup>-/-</sup> zebrafish from now on (Fig. 3F). As with the *Mlc1*<sup>-/-</sup> mouse (22), the homozygous *mlc1*<sup>-/-</sup> zebrafish turned out to be viable and fertile, with the expected mendelian ratio among adult descendants.

### Expression pattern of *mlc1* in the adult zebrafish brain and retina

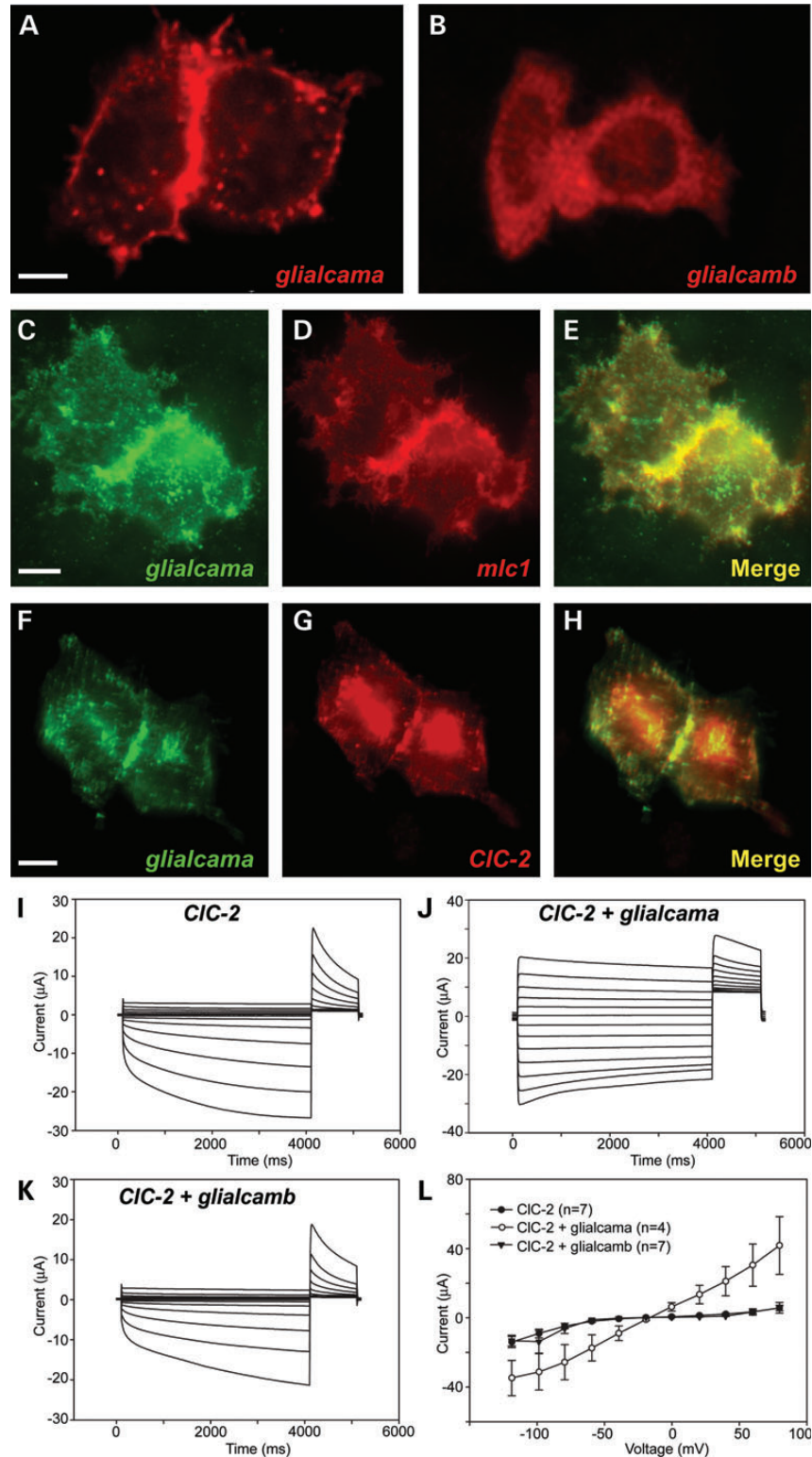
We determined the expression pattern of *mlc1* in adult tissues by RT-qPCR (Fig. 4A) and western blot (Fig. 4B). This showed that *mlc1* is mainly expressed in the brain and at reduced levels in the eye. We performed immunofluorescence experiments to determine which cell types express *mlc1* in the adult brain, using the *mlc1*<sup>-/-</sup> zebrafish as a control. Prominent immunoreactivity was observed at the ventricular and pial surface of the brain, and around some blood vessels (Fig. 4C, D, F). Additionally, *mlc1* immunoreactivity was observed in radial processes within the brain parenchyma (Fig. 4D). Lack of staining in the *mlc1*<sup>-/-</sup> zebrafish brain confirmed the specificity of our results (Fig. 4E). Staining of *mlc1* in the transgenic line *flil1a:GFP*, which expresses GFP in the vascular endothelium (28), confirmed that the *mlc1* protein is present at astrocytic perivascular processes (Fig. 4F). *mlc1* staining around brain ventricles and radial-like structures was also positive for glial fibrillary acid protein (gfap) antibody (Fig. 4G and H), indicating that these are astroglial-like cells (29). Thus, expression of *mlc1* in the zebrafish brain is very similar to that found in humans.

We also analysed the localization of *mlc1* in the retina. High expression of *mlc1* was detected at the inner limiting membrane of the retina. Specificity of the antibody was confirmed by lack of staining in *mlc1*<sup>-/-</sup> zebrafish retina (Fig. 4I and J). Double immunostaining with gfap demonstrated that *mlc1* was strongly expressed in Müller glia end-feet in the inner limiting membrane (Fig. 4K). Furthermore, we also observed weak *mlc1* and gfap co-expression at fine radial glial processes away from the vitreal surface of the retina (Fig. 4K).

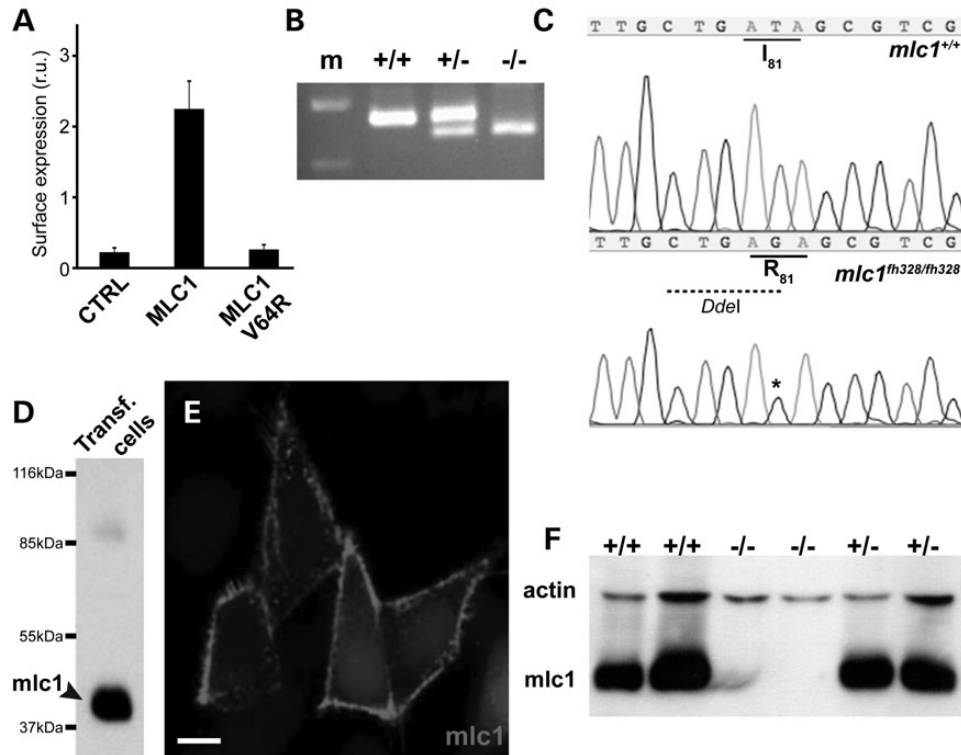
### Glialcam localization in the adult brain and retina is affected in *mlc1*<sup>-/-</sup> zebrafish

As with *mlc1*, we determined the pattern of expression of *glialcam* using RT-qPCR in adult tissues. mRNA for *glialcam* was more broadly expressed compared with *mlc1*, but showed the highest expression levels in the brain. Detection of *glialcam* protein in tissue extracts by western blot using a newly developed *glialcam* antibody (Supplementary Material, Fig. S3D) confirmed its higher expression in the brain (Fig. 5B), and its presence in the eye.

We next addressed the localization of *glialcam* in brain and retina from wild-type and *mlc1*<sup>-/-</sup> zebrafish (Fig. 5C and D). Similar to *mlc1*, we detected strong immunoreactivity to *glialcam* in radial glial cell bodies and their processes (Fig. 5C and D), which were also positive for gfap (Fig. 5E). In contrast,



**Figure 2.** Characterization of the zebrafish orthologues of *Mlc1* and *Glialcam*. (A and B) *glialcam* and *glialcamb* were transfected separately in HeLa cells and detected through the FLAG epitope with immunofluorescence. While *glialcam* is specifically located in cell–cell junctions, *glialcamb* protein presented a diffuse location. Scale bar: 10  $\mu\text{m}$ . (C–E) Co-transfection of *glialcam* and *mlc1* in HeLa cells reveals their co-localization at cell junctions. Scale bar: 10  $\mu\text{m}$ . (F–H) Co-transfection of *glialcam* and rat *CIC-2* in HeLa cells reveals their co-localization at cell junctions. Scale bar: 10  $\mu\text{m}$ . (I–L) A typical current trace mediated by rat *CIC2* (I) expressed in oocytes and after co-expression with *glialcam* (J) or *glialcamb* (K). Only *glialcam* is able to modify the functional properties of *CIC-2*. The apparent inactivation observed sometimes at very negative voltages is an artefact caused by chloride depletion inside the oocytes (J). (L) Average steady-state current–voltage relationship of *CIC-2* (black circles) and *CIC-2* co-expressed with *glialcam* (white circles) or with *glialcamb* (triangles). *Glialcam* increased *CIC-2*-mediated conductance and changed its rectification properties.



**Figure 3.** Generation of a zebrafish model for MLC based on the inactivation of *mlc1*. (A) Expression in *Xenopus* oocytes of human MLC1 carrying the V64R mutation abolishes its surface expression, as assayed by detection by an ELISA-based assay. (B) Restriction analysis with *Ddel* allows for the identification of wild-type (+/+), heterozygous (+/-) or homozygous mutant (-/-) fish of the *mlc1*<sup>fh328</sup> allele. m: molecular weight marker. (C) Zebrafish *mlc1*<sup>fh328</sup> allele originates the I81R mutation, and generates a *Ddel* restriction site. (D and E) Custom-generated antibody against *mlc1* detects a protein of the expected molecular weight (around 42 kDa, arrowhead) and its localization in the membrane on *mlc1*-transfected HeLa cells. The band observed at about 85 kDa corresponds to *mlc1* dimers. Scale bar (E): 10  $\mu$ m. (F) Western blot of brain extracts from adult wild-type (+/+), heterozygous (+/-) or homozygous mutant (-/-) fish for the *mlc1*<sup>fh328</sup> allele demonstrates the absence of the *mlc1* protein in the homozygous zebrafish.

a more diffuse glialcama staining was observed in the same brain regions in *mlc1*<sup>-/-</sup> zebrafish (Fig. 5F). We addressed if lack of detection was due to reduced protein expression by western blot using brain extracts, but no changes in protein expression levels were observed (Fig. 5G). We also studied glialcama localization in the retina, as its laminar arrangement could allow easier visualization of subcellular mislocalization. As observed for *mlc1*, glialcama was highly expressed at Müller glia end-feet at the inner limiting membrane (Fig. 5H and I). This expression was absent in *mlc1*<sup>-/-</sup> zebrafish. Thus, as we observed in the brain, glialcama was mislocalized in the retina of *mlc1*<sup>-/-</sup> zebrafish (Fig. 5J).

We can conclude that lack of *mlc1* in zebrafish causes glialcama mislocalization in glial cells in the brain and retina, in a similar manner to that found in *Mlc1*<sup>-/-</sup> mice (22).

### Comparison of mouse and zebrafish Mlc1 knockout phenotypes

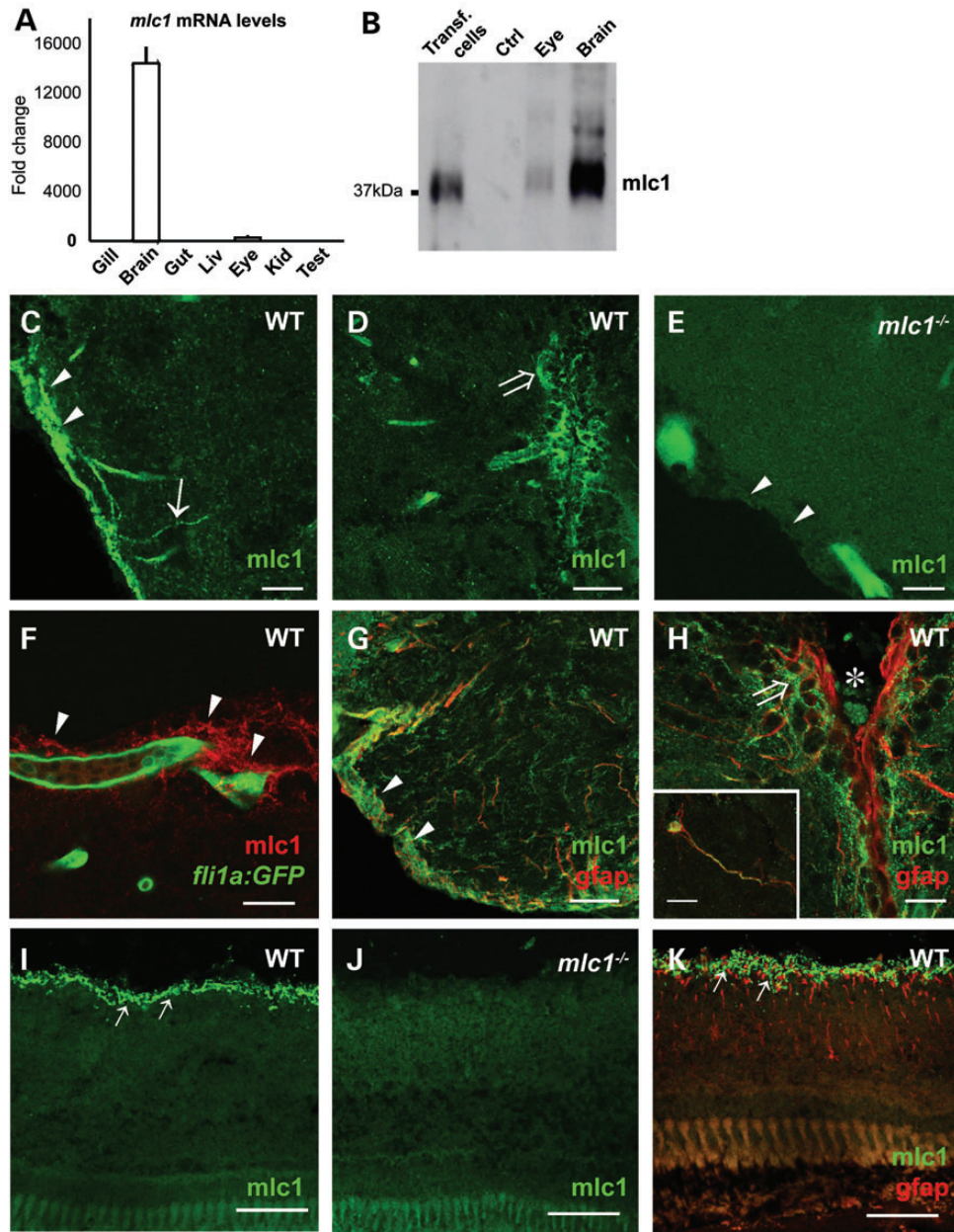
The phenotypes of *Mlc1* mouse and zebrafish knockouts were compared. Histopathology of brain sections from *Mlc1*<sup>-/-</sup> mice revealed largely restricted myelin vacuolization in fibre tracts of the cerebellum (22). In agreement with these histology results, *T*<sub>2</sub>-weighted MRI of the brain of *Mlc1*<sup>-/-</sup> mice showed lesions in white matter tracts of the cerebellum from about 6 months of age that increased with age (Fig. 6A and B).

Measurement of brain volume revealed that the whole brain is bigger in *Mlc1*<sup>-/-</sup> than in wild-type mice at the same age (Fig. 6G).

In zebrafish, we analysed the brain of four adult (14 months old) *mlc1*<sup>-/-</sup> zebrafish by MRI. We only observed very minor lesions in the telencephalon and mesencephalon (Fig. 6C–F) which showed similar relaxation times as cerebrospinal fluid, thus suggesting that they were due to increased fluid. As in mice, measurements of different brain areas revealed that the telencephalon seems larger in comparison with the whole brain in mutant than in wild-type zebrafish (Fig. 6H).

Thus, both animal models showed two typical MLC features: megalencephaly and increased fluid accumulation. However, we failed to observe the presence of vacuoles in any region of the zebrafish brain by general histological procedures (eight different animals; Supplementary Material, Fig. S4A and B) or electron transmission microscopy (four different animals; Supplementary Material, Fig. S4E and F). We conclude that the *mlc1*<sup>-/-</sup> zebrafish develops less severe lesions than the *Mlc1*<sup>-/-</sup> mice in the brain, which in turn also develops a less severe phenotype than humans.

As glialcama and *mlc1* are co-expressed in Müller cells in the retina, we also studied and compared retina morphology between mice and zebrafish. As in *Mlc1*<sup>-/-</sup> mice (22), the retina of *mlc1*<sup>-/-</sup> zebrafish did not show lesions after histological staining (Supplementary Material, Fig. S4C and D). We also

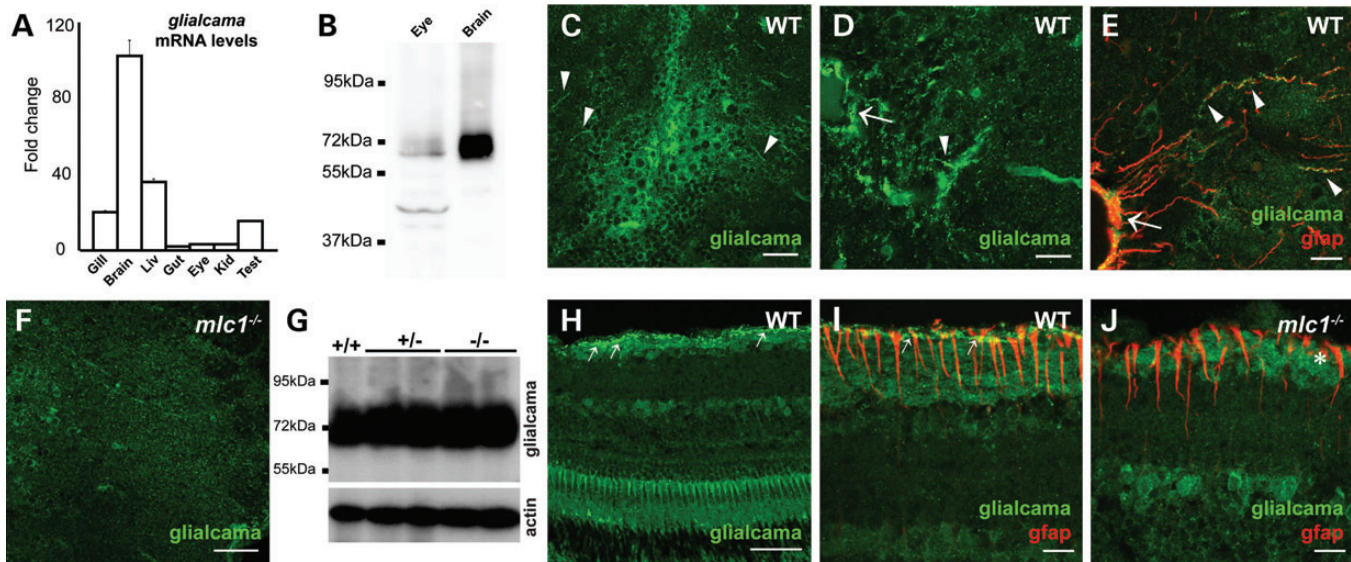


**Figure 4.** *mlc1* expression and localization pattern in adult zebrafish. (A) qPCR with RNA from adult tissues shows the expression of *mlc1* almost exclusively in the brain, and at a lesser level in the eye. (B) Western blot with the custom *mlc1* antibody shows its expression on the brain and eye. As controls, we used extracts from *mlc1*-transfected and untransfected HeLa cells. (C–F) Immunofluorescence detection of *mlc1* in the zebrafish adult brain. (C) *mlc1* is expressed in radial glia processes (arrow) and pial end-feet (arrowheads). (D) *mlc1* expression surrounds the ventricle of the brain (open arrow). (E) No immunoreactivity is observed in *mlc1*<sup>-/-</sup>. Arrowheads point to the pial surface of the brain. Scale bars: 20  $\mu$ m. (F) Localization of *mlc1* (red) in glial perivascular processes (arrowheads) around blood vessels (green) in the brain of *afli1a::GFP* transgenic zebrafish. Scale bar: 10  $\mu$ m. (G and H) *mlc1* co-localizes with the astrocytic protein *gfap* in the zebrafish adult brain at the pial (arrowhead in G) and ventricular surfaces of the brain (open arrow in H). Asterisk labels the ventricle. Scale bars: 15  $\mu$ m. Inset: *gfap* and *mlc1* co-expression at the cell body and radial processes of an astrocyte located in a subependymal zone. Scale bar: 15  $\mu$ m. (I–K) Localization of *mlc1* on the retina. (I) *mlc1* is expressed in the inner limiting membrane (arrows) of the retina. (J) No immunoreactivity against *mlc1* is observed in *mlc1*<sup>-/-</sup> zebrafish retina. (K) Double immunofluorescence with *gfap* (red) confirms *mlc1* expression (green) in radial glia processes and Müller glia end-feet (arrow) at inner limiting membrane. Scale bars: 100  $\mu$ m.

evaluated the visual function by recording electro-retinograms (ERG) in *Mlc1*<sup>-/-</sup> mice and *mlc1*<sup>-/-</sup> zebrafish (Supplementary Material, Fig. S5). No significant differences of the means of b-wave amplitude between wild-type and *mlc1*<sup>-/-</sup> fish at any light condition were observed (Supplementary Material, Fig. S5A). The relation of normalized b-wave amplitude and

the light intensity (inset in Supplementary Material, Fig. S5A) showed complete overlaps between the two groups, suggesting that the sensitivity in *mlc1*<sup>-/-</sup> fish does not differ from wild-types. Similar observations have been found in 2-month-old adults (Supplementary Material, Fig. S5B). Similar tests were performed on 1-year-old adult *Mlc1*<sup>-/-</sup> mice. Analysis of the





**Figure 5.** Glialcama is mislocalized in *mcl1*<sup>-/-</sup> zebrafish. (A) qPCR with RNA from adult tissues shows the highest expression of *glialcama* in the brain, but also in other tissues. (B) Western blot with the custom antibody shows glialcama expression on the brain and eye. (C and D) Immunofluorescence detection of glialcama in the zebrafish adult brain. We observed glialcama expression both in radial processes (arrowheads in C and D) and end-feet (arrow in D). Scale bars: 50  $\mu$ m in (C), 20  $\mu$ m in (D). (E) Co-localization of glialcama (green) and the astrocytic protein gfap (red) at radial glia processes (arrowheads) and end-feet (arrow). Scale bar: 20  $\mu$ m. (F) glialcama signal is more diffuse in the brain of *mcl1*<sup>-/-</sup> zebrafish. Scale bar: 50  $\mu$ m. (G) Expression levels of glialcama in the brain are not different between wild-type (+/+), heterozygous (+/-) and *mcl1*<sup>-/-</sup> zebrafish. Actin level was used as a loading control. (H–J) Localization of glialcama on the retina. (H) Strong expression is observed at the inner limiting membrane (arrows) of the retina in wild-type zebrafish. (I) Double immunofluorescence with gfap confirms glialcama expression in Müller glia end-feet (arrows). Note the funnel-like form of Müller glia end-feet. (J) In *mcl1*<sup>-/-</sup> zebrafish, only a diffuse labelling is observed with no strong expression in the inner limiting membrane (asterisk). Scale bars: 100  $\mu$ m in (H), 20  $\mu$ m in (I) and (J).

amplitudes of the different components of the ERG showed no significant differences between wild-type and *Mcl1*<sup>-/-</sup> mice (Supplementary Material, Fig. S5C).

#### Human GLIALCAM is also mislocalized in the Bergmann glia of a MLC1 patient

Our studies with *Mcl1*<sup>-/-</sup> mice and *mcl1*<sup>-/-</sup> zebrafish have revealed mislocalization of GlialCAM in astrocytes and oligodendrocytes. However, previous studies from a biopsy of a MLC patient indicated that GLIALCAM was not mislocalized around blood vessels in the cortex (13).

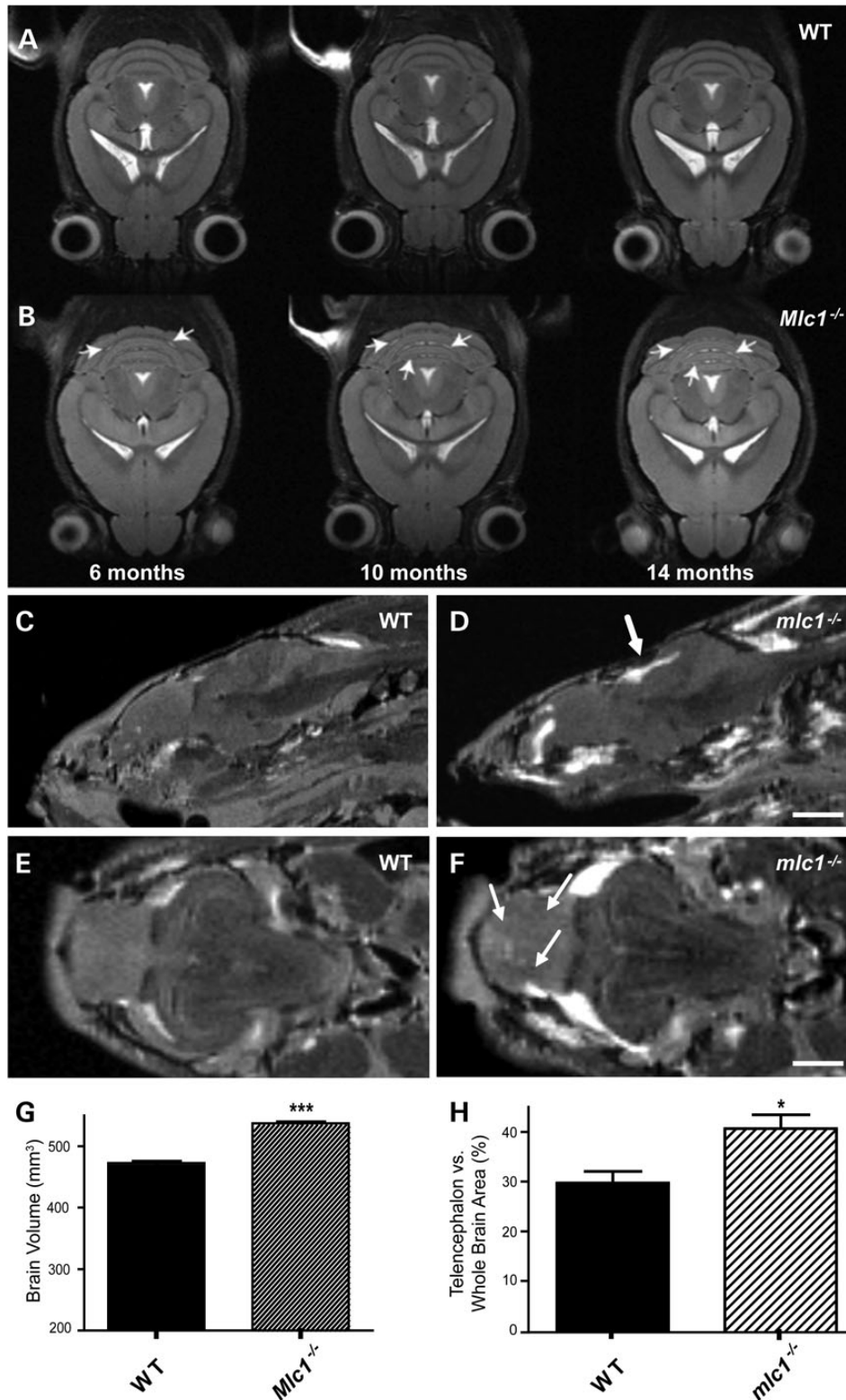
We re-examined the localization of GLIALCAM in the cerebellum of this same human brain biopsy. We focused on the cerebellum, as it is more severely affected in *Mcl1*<sup>-/-</sup> mice (22). As previously shown (13), we could not detect MLC1 in Bergmann glia from the MLC patient (Fig. 7A–F). In addition, staining with GLIALCAM antibodies revealed that it was in fact mislocalized in Bergmann glia in the MLC patient (Fig. 7G–L). Control staining with GFAP revealed that these changes were not due to defects in the integrity of the tissue. Thus, we can conclude that the mislocalization of GLIALCAM caused by the absence of MLC1 is a conserved feature from fish to humans, even though the phenotype is more severe as we climb the evolutionary ladder.

#### VRAC activity in cultured astrocytes from *Mcl1*<sup>-/-</sup> mice is still present

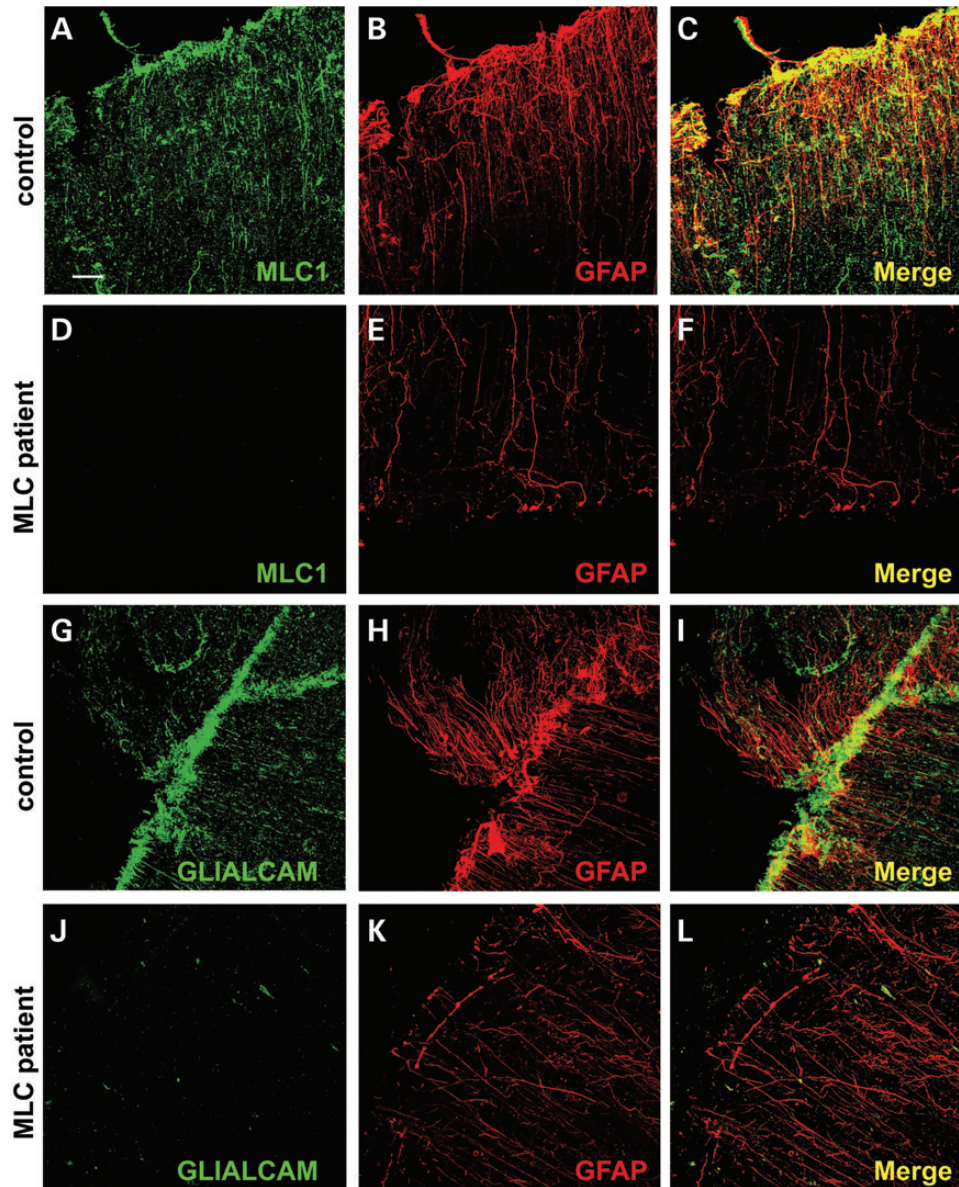
We cultured astrocytes from *Mcl1*<sup>-/-</sup> mice and analysed GlialCAM localization. Unexpectedly, lack of *Mcl1* did not change

GlialCAM localization (Fig. 8A–D) and expression (Fig. 8E) in *Mcl1*<sup>-/-</sup> astrocyte cultures. This result agreed with previous experiments that showed that knocking down *Mcl1* in rat astrocytes changed neither the expression nor the localization of GlialCAM in cell junctions (13).

As MLC1 have been related with the activity of VRAC (14,15), we analysed chloride currents in *Mcl1*<sup>-/-</sup> astrocyte cultures. In wild-type and *Mcl1*<sup>-/-</sup> astrocytes, replacing intra- and extracellular Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> ions with Cs<sup>+</sup> (to block sodium and potassium currents) and with symmetric Cl<sup>-</sup>, the whole-cell background conductance was very low (Fig. 8F). In both type of astrocytes, hypotonicity challenge promoted a large, reversible increase in ramp current in the whole range of membrane potentials (Fig. 8F and Supplementary Material, Fig. S6A and C). These hypotonicity-activated currents reversed at  $\sim$ 0 mV, were blocked by the specific VRAC inhibitor 4-(2-butyl-6,7-dichlor-2-cyclopentylindan-1-on-5-yl) oxobutyric acid (DCPIB) (30), and showed instantaneous activation and time-dependent inactivation at more positive potentials (Fig. 8F and Supplementary Material, Fig. S6A–D). These data indicated that hypotonicity-activated VRAC channels in wild-type and *Mcl1*<sup>-/-</sup> mouse astrocytes which are functionally identical to those described in rat astrocytes (31,32). The observation that the putative ClC-2 inhibitor cadmium (33) did not affect the hypotonicity-activated currents (Supplementary Material, Fig. S6E and F) strongly indicated that these Cl<sup>-</sup> currents were not mediated by ClC-2, which is also present in mouse astrocytes (34). Comparison of VRAC amplitudes between wild-type and *Mcl1*<sup>-/-</sup> astrocytes indicated that VRAC was slightly reduced in astrocytes obtained from *Mcl1*<sup>-/-</sup> mouse (Fig. 8G). These results support the view that *Mcl1* does not mediate directly



**Figure 6.** MRI of *Mlc1*<sup>-/-</sup> mice and *mlc1*<sup>-/-</sup> zebrafish. (A and B) MRI of mice from different ages show progressive presence of white matter lesions (arrows) in the cerebellum of *Mlc1*<sup>-/-</sup> animals (B), but not in wild-type mice (A). (C–F) MRI of adult zebrafish reveals the presence of small lesions in the mesencephalon (thick arrow in D) and telencephalon (arrows in F) in *mlc1*<sup>-/-</sup> zebrafish. Hyperintense signals in (D) and (F) may correspond to fat containing tissue in or around the brain. (C) and (E) correspond to images from wild-type zebrafish. Scale bars: 1 mm in (C) and (D), 500  $\mu$ m in (E) and (F). (G) Brain volume is higher in *Mlc1*<sup>-/-</sup> mice. Brain volume was estimated by quantifying the area of consecutive MRI images using ImageJ. Data correspond to seven wild-type and seven *Mlc1*<sup>-/-</sup> mice ( $P < 0.0001$ ). (H) Telencephalon appears bigger relative to the whole brain in *mlc1*<sup>-/-</sup> zebrafish ( $P < 0.05$ ).



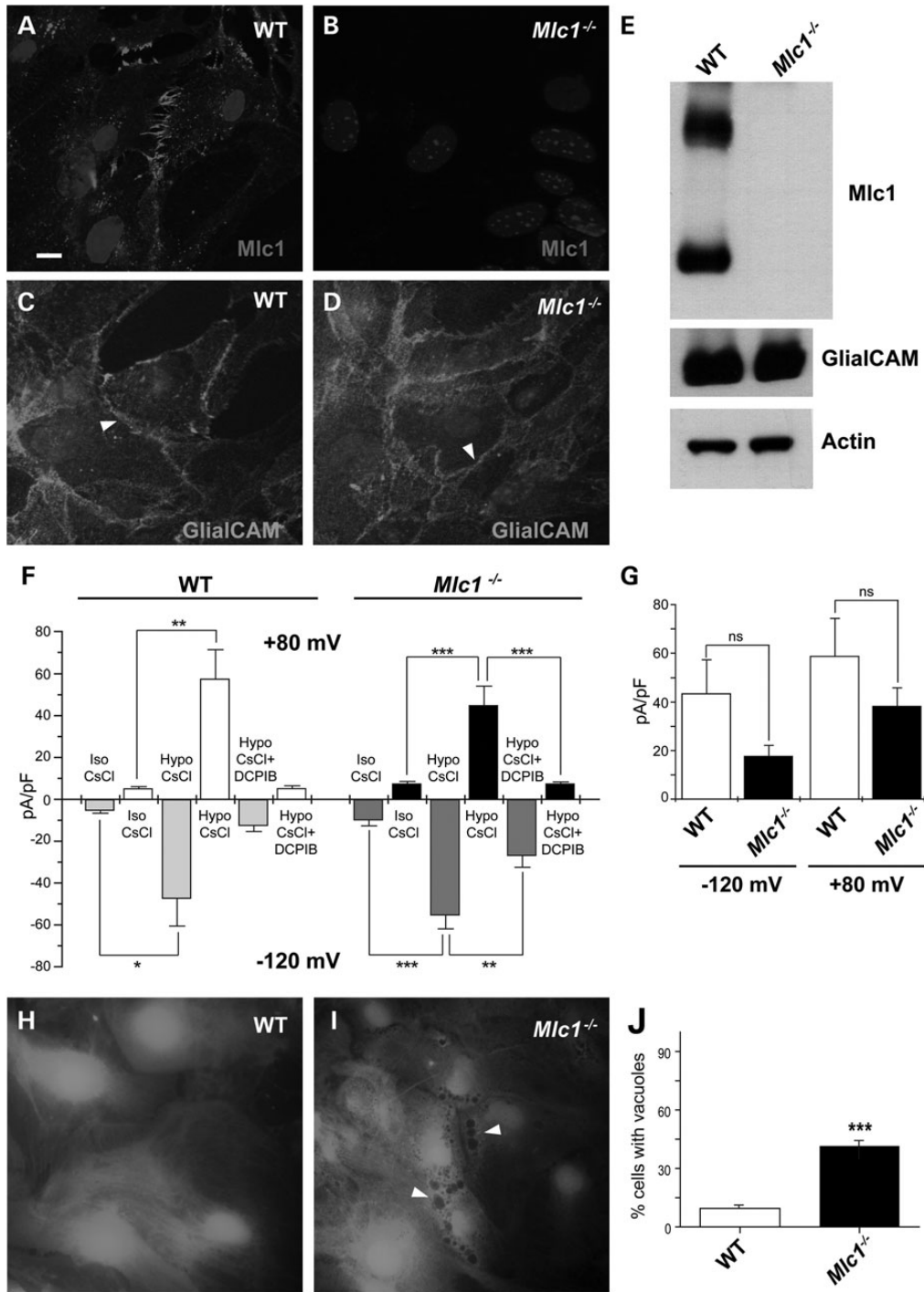
**Figure 7.** GLIALCAM is mislocalized in the cerebellum of a patient with a missense mutation in *MLC1*. (A–F) Immunofluorescence detection of MLC1 and GFAP proteins in the cerebellum of a control subject (A–C) and an MLC patient (D–F) carrying a homozygous mutation in *MLC1* shows the absence of the MLC1 protein in the patient. Scale bar: 40  $\mu\text{m}$ . (G–L) Immunofluorescence detection of GLIALCAM and GFAP proteins in the cerebellum of a control subject (G–I) and an MLC patient (J–L) carrying a homozygous mutation in *MLC1* shows the diffuse signal for GLIALCAM in the absence of MLC1.

VRAC current. To detect whether the non-statistically significant VRAC reduction may lead to astrocyte vacuolation, we stained wild-type (Fig. 8H) and *Mlc1*<sup>-/-</sup> astrocytes (Fig. 8I) with the freely diffusible fluorescent reagent calcein. Vacuoles were more frequently observed in *Mlc1*<sup>-/-</sup> astrocytes (Fig. 8J).

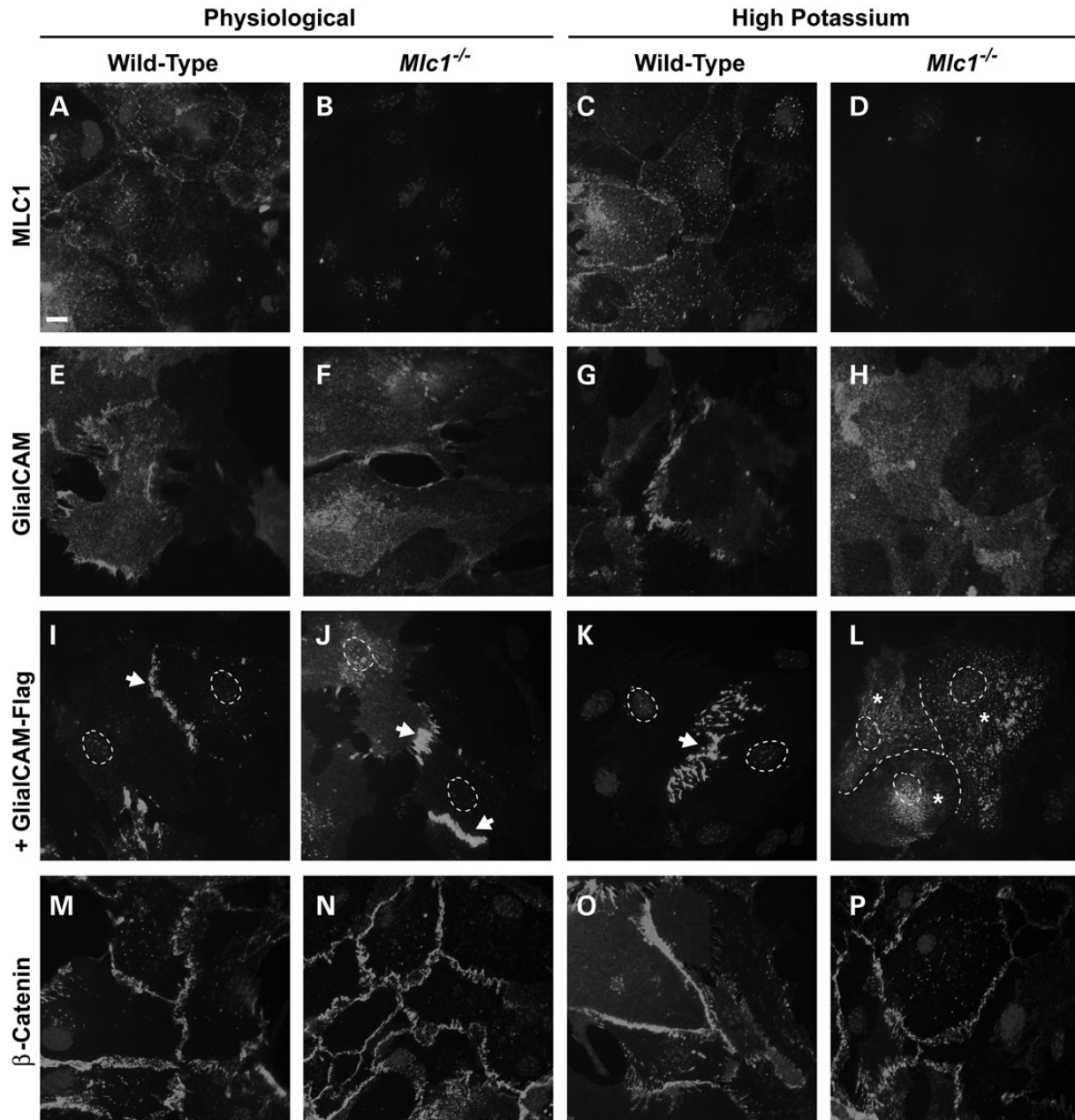
#### Glialcam localization is dependent on Mlc1 with high extracellular potassium concentration

Why is GlialCAM mislocalized in *Mlc1*<sup>-/-</sup> astrocytes in tissue and not in culture? Mislocalization of GlialCAM in humans was better observed in Bergmann glia, which are bathed in a high extracellular potassium concentration due to cerebellar neuronal activity (35). Thus, we treated cultured astrocytes obtained from

wild-type and *Mlc1*<sup>-/-</sup> mice with physiological medium or with an isosmotic solution with higher potassium concentration, mimicking neuronal activity. In wild-type astrocytes under high potassium concentration, there was no change on the localization of Mlc1 (Fig. 9A–D), but there was a slight increase of GlialCAM in cell junctions. When similar experiments were repeated in astrocytes from *Mlc1*<sup>-/-</sup>, GlialCAM was detected intracellularly after high-potassium treatment (Fig. 9E–H). This effect was even more evident when astrocytes were infected with adenoviruses expressing human Flag-tagged GLIALCAM (Fig. 9I–L). Control staining with the junctional marker  $\beta$ -catenin revealed that these distribution changes caused by increasing extracellular potassium were specific to GlialCAM (Fig. 9M–P).



**Figure 8.** Cultured *Mlc1*<sup>-/-</sup> astrocytes do not show mislocalization of Glialcam and still present a VRAC response. (A and B) Immunofluorescence detection of Mlc1 in cultured astrocytes from newborn pups confirms the absence of the Mlc1 protein in *Mlc1*<sup>-/-</sup> mice. (C and D) Immunofluorescence detection of Glialcam in cultured astrocytes from newborn pups shows that Glialcam protein is present in cell junctions in *Mlc1*<sup>-/-</sup> mice, unlike it is seen *in vivo*. Scale bar: 10  $\mu$ m. (E) Western blot of brain extracts show no difference in Glialcam protein levels between wild-type and *Mlc1*<sup>-/-</sup> mice. (F and G) Depression of the hypotonicity-evoked chloride current with the Volume Regulated Anion Channel (VRAC) inhibitor DCPIB in wild-type (WT) and *Mlc1*<sup>-/-</sup> mouse cultured astrocytes. (F) Bar graph of membrane current densities (mean  $\pm$  SEM) at +80 mV (upper bars) and -120 mV (lower bars) measured in isotonic (Iso CsCl) and hypotonic conditions (Hypo CsCl) and after addition of DCPIB (10  $\mu$ M) to the hypotonic solution (Hypo CsCl + DCPIB) in wild-type ( $n = 9$ ) and *Mlc1*<sup>-/-</sup> ( $n = 17$ ) astrocytes. Statistical significance was calculated using paired two-tailed Student's *t*-test; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ . (G) Bar graph of DCPIB-sensitive currents (mean  $\pm$  SEM) induced by hypotonic challenge at -120 and +80 mV in wild-type ( $n = 7$ ) and *Mlc1*<sup>-/-</sup> ( $n = 7$ ) mouse astrocytes. Differences in current densities were not significant (ns). (H and I) Typical pictures of astrocytes obtained from wild-type (H) and *Mlc1*<sup>-/-</sup> (I) mice. Arrowheads point to vacuoles observed mostly in *Mlc1*<sup>-/-</sup> astrocytes. (J) Quantification of the number of cells containing vacuoles. A cell was positive for vacuolation if have at least three vacuoles of a size bigger than 0.5  $\mu$ m. Scale bar: 10  $\mu$ m.



**Figure 9.** Glialcam localization to astrocyte junctions depends on Mlc1 and the presence of high extracellular potassium concentration. (A–D) Mlc1 localization in cell junctions in cultured mouse astrocytes do not change between physiological conditions or high extracellular potassium exposure. Scale bar: 10  $\mu$ m. (E–H) Glialcam localization in cell junctions in cultured mouse astrocytes is lost when *Mlc1*<sup>-/-</sup> astrocytes are subjected to 6 h treatment with high extracellular potassium. Four independent experiments gave similar results. (I–L) Adenoviral-mediated expression of human Flag-tagged GLIALCAM in wild-type and *Mlc1*<sup>-/-</sup> cultured mouse astrocytes confirms the effect of the high extracellular potassium concentration on GlialCAM localization in cell junctions (arrows) in the absence of Mlc1, when it is found almost exclusively in the cytoplasm (asterisks). Dotted line in (L) labels the junctions between three adjacent astrocytes. Four independent experiments gave similar results. (M–P) High extracellular potassium concentration does not alter of the localization of a control junctional protein ( $\beta$ -catenin) in cultured mouse astrocytes.

## DISCUSSION

We have analysed two animal models (zebrafish, mice) lacking MLC1 protein and compared them with a brain biopsy from an MLC patient. In all cases, localization of GlialCAM at cell junctions is abolished by lack of MLC1. In cultured mouse astrocytes from *Mlc1*<sup>-/-</sup>, this effect is only observed when mimicking neuronal activity.

Despite the fact that *Mlc1* is one of the most astrocyte-specific genes (36,37) and its mutation leads to MLC (3), its precise function is still unknown. As MLC1 is a membrane protein with low homology to ion channels, a possible role as a channel or transporter has been suggested (6). However, no such function has been found so far. RNA interference experiments of *Mlc1* in cultured astrocytes indicated that it may be a component or regulator of VRAC (14,15). Here, we demonstrate that VRAC activity is

still present in the absence of Mlc1. We conclude that MLC1 may affect VRAC activity in an indirect manner and is not a molecular component of VRAC. In agreement with this hypothesis, very recently it has been demonstrated that VRAC activity is mediated by LRRC8 heteromers (38,39). Further work will be needed to define the biochemical relationship between MLC1/GlialCAM and LRRC8 proteins.

Further insight into MLC1 biology came from the finding that another MLC-causing gene, which encodes the cell adhesion molecule GLIALCAM (4), is necessary for stabilizing and targeting MLC1 to astrocyte junctions (4,15). In contrast, GLIALCAM targeting *in vitro* was independent of MLC1 (19,13). However, recent work performed with *Mlc1*<sup>-/-</sup> and *GlialCAM*<sup>-/-</sup> mice demonstrated that both mutants reproduce MLC symptoms and that Mlc1 is necessary for GlialCAM localization (22).

We decided to expand the repertoire of MLC animal models to solve this contradiction. We have characterized the orthologues of *MLC1* and *GLIALCAM* in zebrafish. The zebrafish (and other teleost fishes) genome contains two *glialcam* paralogues of which only *glialcama* behaves as mammalian *Glialcam* in terms of subcellular localization and modulation of the chloride channel CIC-2 (24). Both *mlc1* and *glialcama* show a similar expression pattern in the brain as murine Mlc1 and Glialcam (4). *mlc1* and *glialcama* are localized to glial cells especially around brain barriers, radial glia processes and end-feet, and also in Müller glia of the retina.

We have generated a zebrafish line carrying a mutation in *mlc1* that abrogates its protein expression. However, the conservation of *mlc1* in zebrafish does not translate into a severe MLC-like phenotype. We could only detect minor lesions and megalencephaly in the brain of *mlc1*<sup>-/-</sup> zebrafish by MRI, but not myelin vacuolization even in fish older than 1 year. Although in humans MLC is evident during the first year of life (1), mouse knockout models of both *Glialcam* and *Mlc1* did not present vacuolization during their first months of life (22). This difference could reflect their heterochrony of myelination, and that MLC manifests when myelination is at its highest level (1). Zebrafish show regular compact myelin (40), but protein composition differs: P<sub>0</sub> is the major component of CNS myelin, rather than PLP, like in mammals (41). In the transition from an aquatic to a terrestrial environment, there was a switch from P<sub>0</sub> to PLP as the major CNS myelin protein, which provided more neuroprotection (42). Myelination in zebrafish larvae starts at 3 days post-fertilization (dpf), and *myelin basic protein* expression increases at least till 29 dpf (43), but new myelin deposition has been reported in trout even older than 1 year (44). Another significant difference with mammalian brains is the capacity of the adult zebrafish brain for neurogenesis (45) and even repair after injury (46). This is linked to the capacity for re-myelination (47,48). Therefore, it is possible to speculate that zebrafish are able to repair myelin sheath damage produced by the lack of *mlc1* protein, so vacuolization never reaches a detectable stage by means of histological methods.

Absence of *mlc1* in zebrafish brain leads to the misslocalization of *glialcama*, as we observed in *Mlc1*<sup>-/-</sup> mice. This prompted us to re-examine a human MLC biopsy. We found similar results in the cerebellum of the MLC patient. Thus, the reciprocal relationship between MLC1 and GlialCAM for their correct membrane localization has been conserved throughout

evolution. This relationship also explains the fact that mutations in either *MLC1* or *GLIALCAM* cause a similar phenotype in MLC1 and MLC2A patients (21).

It has been well described that MLC1 depends on GLIALCAM for exiting the endoplasmic reticulum and reaching its junctional localization (15). However, a question remains: why does GLIALCAM mislocalize in the absence of MLC1 *in vivo*? We believe that MLC1 is not working as a chaperone of GLIALCAM, as GLIALCAM *in vitro* is able to traffic to cell junctions in the absence of MLC1. In agreement with this hypothesis, GlialCAM mislocalization in *Mlc1*<sup>-/-</sup> astrocytes in culture only appeared when mimicking neuronal activity by an increase in extracellular potassium. Thus, differences between *in vivo* and *in vitro* effects of MLC1 on GlialCAM localization may be due to the presence of interacting molecules *in vivo* that are not present in culture.

We also suggest that GlialCAM/MLC1 may have a role in the process of potassium siphoning by glial cells. As a result of neuronal electrical activity, potassium is released in order to repolarize the membrane potential, and this excess of potassium needs to be disposed of in a process known as 'potassium siphoning' (49). Glial cells surrounding neurons take up potassium by Kir4.1 channels and then transfer it through Connexin junctions to the astrocytic end-feet surrounding blood vessels, where it is eliminated. Ablation of Kir4.1 (50) or Connexins 32 and 47 (51) results in leukodystrophy characterized by water accumulation in myelin. Work with *Mlc1*<sup>-/-</sup>, *GlialCAM*<sup>-/-</sup> and *Cln2*<sup>-/-</sup> mice models (22,60) and the identification of mutations in *CLCN2* in human patients with leukodystrophy (26) have suggested that the chloride channel CIC-2 may also have a role in potassium-coupled chloride influx. In this sense, GlialCAM changes the rectification of the CIC-2 channel (24), allowing chloride influx at depolarized voltages. Interestingly, new studies with CIC-2 from *C. elegans* have also shown that the primary role of CIC-2 is to mediate chloride influx but not efflux (52). Unfortunately, the precise role of MLC1 in this process is still not known. However, based on these studies, we can speculate that it may have a regulatory role controlling the surface expression of GLIALCAM, which may be needed to regulate in turn the activity of CLC-2. Possibly, the severity of the phenotype caused by the depletion of Mlc1 from fish to mouse and human could be explained based on differences in neuronal activity between species, making Mlc1 or Glialcam more necessary to keep ionic homeostasis in the possibly more active human CNS.

In summary, our work show that the functional relationship between the two proteins causing MLC in vertebrates is evolutionary conserved. We have also increased the diversity of vertebrate animal models for this disease that can offer further insights into the molecular interactions between these two proteins. Our work also explains the similarity of phenotypes caused by mutations in either gene. More importantly, we uncovered a role for MLC1 in GlialCAM localization at astrocyte junctions in the presence of neuronal activity, offering new mechanistic insights into the pathophysiology of MLC.

## MATERIALS AND METHODS

### Zebrafish maintenance

AB or AB/TL strains were used in all the experiments. Adult fish were maintained in the animal facility at the University of

Barcelona, School of Medicine in Bellvitge Campus, under the standard culture conditions: 28°C, 14 h/10 h light/dark period (53). All experimental procedures conformed to the European Community Guidelines on Animal Care and Experimentation and were approved by animal care and use committees.

The *mlc1<sup>fh328</sup>* allele was obtained from the laboratory of Dr Cecilia Moens, as a result of an ENU-based TILLING screening (62). The mutant line was generated in an *islet1::GFP* background, which was eliminated by out-crossing to AB wild-type fish. Similarly, two other embryonic recessive lethal phenotypes that were not linked to *mlc1<sup>fh328</sup>* were eliminated by pair-wise mating and out-crossing. The *mlc1<sup>fh328</sup>* mutation is a T/G transversion in *mlc1* exon 3 that generates a novel *DdeI* restriction site (CTNAG), which was used for genotyping after amplifying the corresponding fragment of genomic DNA by PCR. The following oligonucleotides were used: TAAATGTGTCTATCTG TATCTGACCGTCAG (underlined is a mutation introduced to eliminate an endogenous *DdeI* restriction site, 16 nucleotides upstream from the *DdeI* restriction site generated by the mutation) and TACTCTGCAAGCCAAAAGCA. Genomic DNA was obtained from tail clipping and extraction by Nucleo Spin Tissue kit (Macherey-Nagel).

#### Mlc1 knockout mice

*Mlc1<sup>-/-</sup>* mice were generated by ICS (Institut Clinique de la Souris, Strasbourg, France) as described previously (22).

#### Human samples

The MLC patient sample analysed here was already reported (13). Briefly, she carried a homozygous mutation in the *MLC1* gene, resulting in an amino acid change (p.S69L) that leads to the reduced stability of the MLC1 protein and its practical absence.

#### Molecular biology

Plasmids used were constructed using standard molecular biology techniques employing recombinant PCR and the Multi-site Gateway system (Invitrogen). The integrity of all cloned constructs was confirmed by DNA sequencing. For localization studies in HeLa cells, proteins were C-terminally fused to the FLAG epitope or HA-tagged and cloned into the pcDNA3 vector (Invitrogen).

#### RT-PCR

Adult zebrafish were euthanized using an overdose of tricaine (MS222, Sigma), and tissues were quickly dissected and flash-frozen in liquid nitrogen. Total RNA was isolated with TRIZOL (Life Technologies) and retro-transcribed (RT-PCR) using random hexamers with SuperScript III system (Life Technologies). The following oligonucleotides pairs were used for qPCR: GCACGTTTCAGTGGACAACCTG and CACAATCATTGGCCTTCAG (*mlc1*), CCCACCCACCAAGACTAAGC and CATCCTCAGTCGTGCTCATCTG (*glialcama*), and as internal controls (54): CTGGAGGCCAGCTCAAACAT and ATCAAGAAGAGTAGTACCGCTACCATTAC (*ef1a*), TCTGGAGACTGTAAGAGGTATGC and AGACGCACAATC

TTGAGAGCAG (*rpl13a*). qPCR was performed with SYBR Select reagent (Life Technologies) in a StepOne apparatus (Life Technologies). The expression levels were calculated using the comparative  $C_t$  method normalized to the internal control genes. The final results were expressed as the relative RNA levels as indicated in the corresponding figures, taking into account the efficiency of each primer pair with the Pfaffl method (55).

#### Generation of custom antibodies against zebrafish proteins

Immune sera against synthetic peptides from zebrafish *mlc1* (QREEASAQEVFSYAQMST, corresponding to amino acids 2–19, in green in Supplementary Material, Fig. S1B) and zebrafish *glialcama* (EDPPTDGENTMHHSLPR, corresponding to amino acids 405–422, in green in Supplementary Material, Fig. S2B) were raised in rabbits using the services provided by Eurogentec. The peptide was coupled to keyhole limpet haemocyanin via a cysteine residue that has been added to the N-terminal end of the peptide for *mlc1* and to the C-terminal of the peptide for *glialcama*. After four boosts of immunization, the antisera were affinity purified using the peptide covalently coupled to Sulpholink (Pierce). The polyclonal antibodies were tested by immunoblotting and immunofluorescence on HeLa cells expressing *mlc1* or *glialcama* and on zebrafish brain tissue.

#### Cell culture and immunofluorescence microscopy

HeLa cells were grown on DMEM containing 10% (v/v) fetal bovine serum (Sigma) and 1% penicillin/streptomycin at 37°C in a humidity controlled incubator with 10% CO<sub>2</sub>. Cells were cultured and transfected with the Transfectin reagent (BioRad). Twenty-four hours after transfection, the cells were splitted and transferred into glass-covered petri dishes in which experiments were performed after further 24–48 h. To detect expressed proteins, immunofluorescence staining of cells was performed. They were fixed with phosphate-buffered saline (PBS) containing 3% paraformaldehyde for 15 min, blocked and permeabilized with 10% FBS and 0.1% Triton X-100 in PBS for 2 h at room temperature (RT). Primary antibodies were diluted in the same solution and incubated overnight at 4°C. Cells were washed and incubated for 2 h at RT with secondary antibodies. Cover slips were mounted in Vectashield medium (Vector Laboratories) with 1.5 µg/ml DAPI (Sigma) and visualized using an Olympus DSU spinning disk confocal.

Images were analysed using ImageJ. Pairs of cells were analysed manually and quantified as being in junctions or not being in junctions (around the plasma membrane or intracellular). Intensity profile analysis was used to discern the localization.

#### Histological staining methods

For immunofluorescence in zebrafish, individuals were deeply anaesthetized in 0.1% tricaine (MS222, Sigma) in fresh water, and then transcardiacally perfused with 4% paraformaldehyde. Fish heads were post-fixed for 24 h at RT. Then brains and eyes were dissected out, cryoprotected and frozen with liquid

nitrogen-cooled methylbutane. Transverse sections (12  $\mu\text{m}$  thick) were cut on a cryostat and mounted onto gelatinized slides.

Sections were rinsed in PBS and pre-incubated with normal goat serum (Sigma, 1:100) for 1 h. Next, they were incubated with a primary antibody or a cocktail of primary antibodies overnight at room temperature. Antibody dilutions used were: rabbit anti-zebrafish *mlc1*, 1:100; rabbit anti-zebrafish *glialcam*, 1:100; mouse anti-gfap (ZIRC), 1:500; rat anti-GFP (Nacalai Tesque), 1:1000. After PBS washes, sections were incubated with secondary fluorescent antibodies (Alexa Fluor 488 or 568, 1:500, Invitrogen) for 1 h. After additional PBS washes, sections were mounted using the glycerol-based mounting medium.

For haematoxylin–eosin staining, we used paraffin sections from tissue fixed in Bouin's fixative. Sections were de-waxed and stained using Meyer's haematoxylin followed by eosin. Sections were dehydrated and mounted for imaging.

Zebrafish sections were observed and photographed either under a laser scanning confocal microscope (Nikon A1R) or a bright-field microscope (Nikon E100). Images were adjusted for brightness and contrast with Adobe Photoshop or Corel Photopaint, and they were assembled with Adobe Illustrator.

Human samples were processed and analysed as described previously (13).

### Electron microscopy

For electron immunogold experiments, small samples of brain mice tissue were obtained and fixed in 4% paraformaldehyde and 0.1% glutaraldehyde in 0.12 M phosphate buffer, and processed. They were cryoprotected gradually in sucrose and cryo-fixed by immersion in liquid propane. Freeze substitution was performed at  $-90^\circ\text{C}$  during 3 days in an Automatic Freeze Substitution System (AFS, Leica); methanol containing 0.5% uranylacetate was used as a substitution medium. Infiltration was carried out in Lowicryl HM20 at  $-50^\circ\text{C}$  and then polymerized with UV light. Ultrathin sections were collected, and when needed, processed for post embedding immunostaining. For immunostaining, grids were incubated with rabbit anti-*Mlc1* (1:10) or mouse anti-*GlialCAM* (1:10) antisera. The binding of the primary antibody was visualized by incubating with a secondary antibody conjugated to 18 nm gold particles (British BioCell, International). Ependymal cells were recognized by their epithelial location, presence of microvilli and cilia, and high density of organelles in the cytoplasm. Astrocytic processes showed a cytoplasm light appearance with the presence of some fibrils and a very few number of organelles (56).

For electron microscopy of zebrafish myelin sheaths, zebrafish were anaesthetized and transcardially perfused using 4% paraformaldehyde and 0.1% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer with 0.5% calcium chloride. Small pieces of tissue were post-fixed in the same fixative (2 h) and then in 1% osmium tetroxide—with 1.5% potassic ferrocyanide (2 h). Tissue was then dehydrated and included in an epoxy resin. Semithin and thin sections were obtained using an ultramicrotome, mounted and imaged in an electron transmission microscope.

### Astrocyte cultures from wild-type and *Mlc1*<sup>-/-</sup> mice

Mouse astrocyte cultures were performed as previously described from P0 to P2 mouse pups of the corresponding

genotype (16). Calcein stainings were performed by treating the astrocytes with Calcein-AM 2  $\mu\text{M}$  (Life Technologies) for 10 min and then with physiological solution (122 mM NaCl, 3.3 mM KCl, 0.4 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1.3 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 25 mM Hepes, 10 mM glucose, pH 7.2, 300 mOsm/kg). In some experiments, astrocytes were treated for 6 h with physiological solution or high potassium medium (60 mM NaCl, 60 mM KCl, 0.4 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1.3 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 25 mM Hepes, 10 mM glucose, pH 7.2, 300 mOsm/kg), to mimic neuronal activity. Then, they were fixed in 4% PFA and processed for immunofluorescence as described above.

### Mouse magnetic resonance imaging

Mouse MRI experiments were conducted on a 7.0T BioSpec 70/30 horizontal animal scanner (Bruker BioSpin), equipped with a 12 cm inner diameter actively shielded gradient system (400 mT/m) in at least seven animals of the same age. Receiver coil was a phased array surface coil for mouse brain. Animals were placed in a supine position in a Plexiglas holder with a nose cone for administering anaesthetic gases (isoflurane in a mixture of 30%  $\text{O}_2$  and 70%  $\text{CO}_2$ ), fixed using a tooth bar, ear bars and adhesive tape. Tripilot scans were used for accurate positioning of the animal's head in the isocentre of the magnet.

High-resolution  $T_2$ -weighted images were acquired by using TurboRARE (rapid acquisition with rapid enhancement) sequence applying repetition time of 2969 ms, echo time of 36 ms, RARE factor = 8, 10 averages, slice thickness = 0.3 mm, number of slices = 25 for horizontal view, 25 coronal slices, field of view =  $25 \times 25$  mm, matrix size =  $240 \times 240$  pixels, resulting in a spatial resolution of  $0.104 \times 0.104$  mm in 0.3 mm slice thickness.

$T_2$  relaxometry maps were acquired with multislice-multiecho (MSME) sequence by applying 16 different TEs, from 11 to 176 ms, TR = 4764 ms, slice thickness = 0.5 mm, number of coronal slices = 18, FOV =  $20 \times 20$  mm and matrix size =  $256 \times 256$  pixels, resulting in a spatial resolution of  $0.078 \times 0.078$  mm in 0.5.00 mm slice thickness.

### Zebrafish magnetic resonance imaging

Magnetic resonance microimaging ( $\mu\text{MRI}$ ) of zebrafish was performed on a vertical wide-bore 9.4T Bruker Avance 400WB spectrometer, with a 1000 mT/m actively shielded imaging gradient insert (Bruker Biospin GmbH). A birdcage RF coil with an inner diameter 1 cm was used for excitation and detection. The system was interfaced to a Linux PC running Topspin 2.0 and Paravision 5.0 software (Bruker Biospin GmbH). For  $\mu\text{MRI}$ , adult zebrafish were euthanized and fixed in 4% buffered paraformaldehyde (Zinc Formal-Fixx, ThermoShandon) for 3 days and subsequently embedded in Fomblin. Before each  $\mu\text{MRI}$  measurement, the magnetic field homogeneity was optimized by shimming. Each session of measurements began with a multislice orthogonal gradient-echo sequence for position determination and selection of the desired region for subsequent experiments. High-resolution  $T_2$ -weighted imaging was acquired by using TurboRARE (rapid acquisition with rapid enhancement) sequences with echo time (TE) = 10.5 ms; repetition time (TR) = 5000 ms; RARE factor = 4; slice thickness 0.2 mm; number of slices 15; field



of view  $12 \times 12$  mm; image matrix of  $256 \times 256$  pixels, resulting in an in-plane resolution of  $47 \mu\text{m}$ .

$T_2$  relaxation time measurement in zebrafish brain was performed with MSME sequence by applying eight different TEs (8.5, 17.0, 25.5, 34.0, 42.5, 51.0, 59.5 and 68.0 ms); TR = 1.5 s; slice thickness 0.5 mm; number of slices 6, FOV  $12 \times 12 \text{ mm}^2$  and matrix size  $256 \times 256$  pixels, resulting in an in-plane resolution of  $47 \mu\text{m}$ . For calculation of  $T_2$  relaxation time, regions of interest (ROIs) were drawn at various locations within the zebrafish brain. Another ROI in the muscle was used as an internal control. Means and standard deviation for  $T_2$  relaxation times for each ROI were calculated.

### Two-electrode voltage clamp, western and surface expression in *Xenopus* oocytes

*Xenopus* oocytes were injected and maintained as described (57). For rat CIC-2, 10 ng cRNA were injected. When co-expressing, 5 ng cRNA of *glialcama* or *glialcamb* were coinjected with rat CIC-2. Oocytes were perfused with ND96 (in mM): 96 NaCl, 2 KCl, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub> and 5 HEPES/TRIS (pH 7.4). To estimate the specific CIC-2-mediated chloride currents, iodide (80 mM NaI replacing the NaCl), which blocks CIC-2-mediated outward currents (58), was applied in every experiment. Oocytes that did not exhibit a significant block were discarded. Currents were measured using a TEC-05X voltage amplifier and the CellWorks program (npi).

Western blot experiments and surface expression in oocytes were performed similarly as previously described (6).

### Zebrafish electroretinogram recordings

ERGs were performed at 1-month and 2-month-old young adults (at least five animals). The young adults were anaesthetized by fish system water containing 0.75 mM 3-aminobenzoic acid methyl ester (MESAB, Sigma-Aldrich) and 4.6 mM NaHCO<sub>3</sub> before recording. All the experiments were performed at room temperature (20°C).

Fish were dark adapted for at least 30 min and then were placed on the filter paper in the middle of a plastic recording chamber which was filled by 1% agarose. The reference electrode was inserted into the agarose. After the fish was moisturized by a drop of Ringers solution (111 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.6 mM MgCl<sub>2</sub>, 10  $\mu\text{M}$  EDTA, 10 mM glucose and 3 mM HEPES buffer, adjusted to pH 7.7–7.8 with NaOH), the eye was removed by a loop made of tungsten wire. The loop was placed behind the eye and was pressed down to cut the optic nerve. Meanwhile forceps were used to pull the body and discard it. The isolated eye was then positioned to face the light source (ZEISS XBO 75 W). The recording electrode, filled with Ringer's solution, was placed against the centre of the cornea. All these pre-recording steps were done under dim red illumination. Stimulation light intensity was 6000 lux and attenuated by neutral density filters. Stimulus duration was 100 ms and delivered 50 ms after the recording began. Electronic signals were amplified 1000 times by a pre-amplifier (P55 A.C. Pre-amplifier, Astro-Med. Inc, Grass Technology) with a band pass between 0.1 and 100 Hz, digitized by DAQ Board NI PCI-6035E (National Instruments) via NI BNC-2090 accessories and displayed via

self-developed NI Labview program (59). All the figures were prepared by Origin (Microcal Software).

### Mouse electroretinogram recording

The mice were dark-adapted overnight before ERG recording. Under dim red light ( $\lambda > 600 \text{ nm}$ ), the mice were anaesthetized with an i.p. injection of a solution of ketamine (70 mg/kg, Ketolar<sup>®</sup>, Parke-Davies, S.L.) and xylazine (10 mg/kg, Rompún<sup>®</sup>) and kept on a heating pad to maintain normal body temperature at 37°C. A topical drop of 1% tropicamide (Colicursi Tropicamida 1%<sup>®</sup>; Alcon-Cusi, S.A.) were applied to the eyes of the experimental animals before ERG testing. Electrical responses were obtained with Burian-Allen electrodes (Hansen Labs) positioned on the cornea. A drop of methylcellulose (Methocel 2%<sup>®</sup>; Novartis Laboratories CIBA Vision) was positioned on the cornea to improve electrical conductivity. The reference electrode was placed in the mouth, and the ground electrode at the base of the tail. After positioning the electrodes, the mice were placed in a Ganzfeld stimulator. Stimulation flashes were provided by a Ganzfeld dome light source, which ensured a uniform illumination of the retina and provided a wide range of light intensities. Electrical signals generated in the retina were amplified ( $\times 1000$ ) and band filtered between 0.3 and 1000 Hz, using a Grass amplifier (CP511 AC amplifier, Grass Instruments). Electrical signals were digitized at 20 kHz, using a Power Lab data acquisition board (AD Instruments) and displayed on a PC computer monitor. The ERG responses were elicited by stimulation of the retina with light intensities ranging between  $10^{-4}$  and  $10^2 \text{ cd/s/m}^{-2}$ . A series of ERG responses were averaged ( $\approx 20$  ERG traces) for each light intensity, after adjusting the time interval between flashes to ensure complete recovery of the response. Standard ERG waves were recorded according to the method recommended by the International Society for Clinical Electrophysiology of Vision (ISCEV).

### Electrophysiological measurements on mouse astrocytes

Electrophysiological measurements were performed with the whole-cell configuration of the patch-clamp technique as previously described (60). Briefly, pipette had a resistance of 2–4 M $\Omega$  when filled with the intracellular solution. Membrane currents were amplified (amplifier List EPC-7) filtered at 2 kHz ( $-3 \text{ dB}$ ) and acquired at a sample rate of 5 kHz on a microcomputer for off-line analyses (pClamp 6, Axon Instruments and Origin 6.0, MicroCal). The access resistance (below 10 M $\Omega$ ) was corrected for 60–80%. Current densities were calculated by dividing the current values measured at each membrane potential by the cell capacitance estimated from the capacitive transients of the recorded cells corrected by means of the analogical circuit of the patch-clamp amplifier. For the isolation of the Cl<sup>-</sup> conductance, the external perfusing saline, called isotonic (Iso CsCl), was (mM): 122 CsCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 10 TES, 5 glucose, pH 7.4 with CsOH and osmolality  $\sim 320 \text{ mOsm}$  with mannitol. The intracellular (pipette) solution was composed of (mM): 126 CsCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 1 EGTA, 10 TES, pH 7.2 and osmolality  $\sim 300 \text{ mOsm}$  with mannitol. Hypotonic extracellular solution (Hypo CsCl)  $\sim 260 \text{ mOsm}$  was obtained by omitting mannitol. Osmolality was measured with a vapour-pressure osmometer (Wescor 5500, Delcon). All salts and various

molecules were from Sigma. The DCPIB was prepared in DMSO at a concentration 1000-fold higher than that used in the perfusing saline.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Material is available at *HMG* online.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Marisol Montolio and Hernan López-Schier for their help in the initial stages of the project, Esther Prat and Laura González for the management of the *Mlc1* colony, Lara Sedó and Beatriz Gamarra for excellent fish care, Verónica López-Guillín and Catalina Sueiro for assistance with electron microscopy and histology and Lupe Soria for mice MRI. We also thank Thomas J Jentsch and Ian Orozco for critical reading of the article. We also thank IDIBELL and Alvaro Gimeno (Estabulari Bellvitge) for their help to setup the zebrafish facility.

*Conflict of Interest statement.* None declared.

## FUNDING

This work was supported in by SAF 2009-07014 (R.E.) and SAF2012-31486 (R.E.), PS09/02672-ERARE to R.E., ELA Foundation 2009-017C4 and 2012-014C2B project (R.E. and V.N.), 2009 SGR 719 (R.E.), SAF 2009-12606-C02-02 (V.N.), 2009 SGR01490 (V.N.). R.E. is a recipient of an ICREA Academia prize.

## REFERENCES

- Van der Knaap, M.S., Boor, I. and Estevez, R. (2012) Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: chronic white matter oedema due to a defect in brain ion and water homeostasis. *Lancet Neurol.*, **11**, 973–985.
- Van der Knaap, M.S., Valk, J., Barth, P.G., Smit, L.M., van Engelen, B.G. and Tortori Donati, P. (1995) Leukoencephalopathy with swelling in children and adolescents: MRI patterns and differential diagnosis. *Neuroradiology*, **37**, 679–686.
- Leegwater, P.A., Yuan, B.Q., van der Steen, J., Mulders, J., Konst, A.A., Boor, P.K., Mejaski-Bosnjak, V., van der Maarel, S.M., Frants, R.R., Oudejans, C.B. *et al.* (2001) Mutations of *MLC1* (KIAA0027), encoding a putative membrane protein, cause megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Am. J. Hum. Genet.*, **68**, 831–838.
- Lopez-Hernandez, T., Ridder, M.C., Montolio, M., Capdevila-Nortes, X., Polder, E., Sirisi, S., Duarri, A., Schulte, U., Fakler, B., Nunes, V. *et al.* (2011a) Mutant GlialCAM causes megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts, benign familial macrocephaly, and macrocephaly with retardation and autism. *Am. J. Hum. Genet.*, **88**, 422–432.
- Boor, P.K., de Groot, K., Waisfisz, Q., Kamphorst, W., Oudejans, C.B., Powers, J.M., Pronk, J.C., Scheper, G.C. and van der Knaap, M.S. (2005) *MLC1*: a novel protein in distal astroglial processes. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **64**, 412–419.
- Teijido, O., Martinez, A., Pusch, M., Zorzano, A., Soriano, E., Del Rio, J.A., Palacin, M. and Estevez, R. (2004) Localization and functional analyses of the *MLC1* protein involved in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Hum. Mol. Genet.*, **13**, 2581–2594.
- Teijido, O., Casaroli-Marano, R., Kharkovets, T., Aguado, F., Zorzano, A., Palacin, M., Soriano, E., Martinez, A. and Estevez, R. (2007) Expression patterns of *MLC1* protein in the central and peripheral nervous systems. *Neurobiol. Dis.*, **26**, 532–545.
- Van der Knaap, M.S., Barth, P.G., Vrensen, G.F. and Valk, J. (1996) Histopathology of an infantile-onset spongiform leukoencephalopathy with a discrepantly mild clinical course. *Acta Neuropathol.*, **92**, 206–212.
- Leegwater, P.A., Boor, P.K., Yuan, B.Q., van der Steen, J., Visser, A., Konst, A.A., Oudejans, C.B., Schutgens, R.B., Pronk, J.C. and van der Knaap, M.S. (2002) Identification of novel mutations in *MLC1* responsible for megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Hum. Genet.*, **110**, 279–283.
- Montagna, G., Teijido, O., Eymard-Pierre, E., Muraki, K., Cohen, B., Loizzo, A., Grosso, P., Tedeschi, G., Palacin, M., Boespflug-Tanguy, O. *et al.* (2006) Vacuolating megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: functional studies of novel variants in *MLC1*. *Hum. Mutat.*, **27**, 292.
- Wang, J., Shang, J., Wu, Y., Gu, Q., Xiong, H., Ding, C., Wang, L., Gao, Z., Wu, X. and Jiang, Y. (2011) Identification of novel *MLC1* mutations in Chinese patients with megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (MLC). *J. Hum. Genet.*, **56**, 138–142.
- Duarri, A., Teijido, O., Lopez-Hernandez, T., Scheper, G.C., Barriere, H., Boor, I., Aguado, F., Zorzano, A., Palacin, M., Martinez, A. *et al.* (2008) Molecular pathogenesis of megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: mutations in *MLC1* cause folding defects. *Hum. Mol. Genet.*, **17**, 3728–3739.
- Lopez-Hernandez, T., Sirisi, S., Capdevila-Nortes, X., Montolio, M., Fernandez-Duenas, V., Scheper, G.C., van der Knaap, M.S., Casquero, P., Ciruela, F., Ferrer, I. *et al.* (2011b) Molecular mechanisms of *MLC1* and *GLIALCAM* mutations in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Hum. Mol. Genet.*, **20**, 3266–3277.
- Ridder, M.C., Boor, I., Lodder, J.C., Postma, N.L., Capdevila-Nortes, X., Duarri, A., Brussaard, A.B., Estevez, R., Scheper, G.C., Mansvelter, H.D. *et al.* (2011) Megalencephalic leukoencephalopathy with cysts: defect in chloride currents and cell volume regulation. *Brain*, **134**, 3342–3354.
- Capdevila-Nortes, X., López-Hernández, T., Apaja, P.M., López de Heredia, M., Sirisi, S., Callejo, G., Arnedo, T., Nunes, V., Lukacs, G.L., Gasull, X. *et al.* (2013) Insights into MLC pathogenesis: GlialCAM is an *MLC1* chaperone required for proper activation of volume-regulated anion currents. *Hum. Mol. Genet.*, **22**, 4405–4216.
- Duarri, A., Lopez de Heredia, M., Capdevila-Nortes, X., Ridder, M.C., Montolio, M., Lopez-Hernandez, T., Boor, I., Lien, C.F., Hagemann, T., Messing, A. *et al.* (2011) Knockdown of *MLC1* in primary astrocytes causes cell vacuolation: a MLC disease cell model. *Neurobiol. Dis.*, **43**, 228–238.
- Brignone, M.S., Lanciotti, A., Macioce, P., Macchia, G., Gaetani, M., Aloisi, F., Petrucci, T.C. and Ambrosini, E. (2011) The beta1 subunit of the Na,K-ATPase pump interacts with megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts protein 1 (*MLC1*) in brain astrocytes: new insights into MLC pathogenesis. *Hum. Mol. Genet.*, **20**, 90–103.
- Lanciotti, A., Brignone, M.S., Molinari, P., Visentin, S., De Nuccio, C., Macchia, G., Aiello, C., Bertini, E., Aloisi, F., Petrucci, T.C. *et al.* (2012) Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts protein 1 functionally cooperates with the TRPV4 cation channel to activate the response of astrocytes to osmotic stress: dysregulation by pathological mutations. *Hum. Mol. Genet.*, **21**, 2166–2180.
- Chung Moh, M., Hoon Lee, L. and Shen, S. (2005) Cloning and characterization of hepaCAM, a novel Ig-like cell adhesion molecule suppressed in human hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.*, **42**, 833–841.
- Favre-Kontula, L., Rolland, A., Bernasconi, L., Karmirantzou, M., Power, C., Antonsson, B. and Boschert, U. (2008) GlialCAM, an immunoglobulin-like cell adhesion molecule is expressed in glial cells of the central nervous system. *Glia*, **56**, 633–645.
- Van der Knaap, M.S., Lai, V., Kohler, W., Salih, M.A., Fonseca, M.J., Benke, T.A., Wilson, C., Jayakar, P., Aine, M.R., Dom, L. *et al.* (2010) Megalencephalic leukoencephalopathy with cysts without *MLC1* defect. *Ann. Neurol.*, **67**, 834–837.
- Hoegg-Beiler, M.B., Sirisi, S., Orozco, I., Ferrer, I., Hohensee, S., Auberson, M., Gödde, K., Vilches, C., López de Heredia, M., Nunes, V., Estévez, R. and Jentsch, T. (2014) Disrupting *MLC1* GlialCAM and CIC-2 interactions in leukodystrophy entails glial Cl<sup>-</sup> channel dysfunction. *Nat. Commun.*, **5**, 3475.
- Arnedo, T., Aiello, C., Jeworutzki, E., Dentici, M.L., Uziel, G., Simonati, A., Pusch, M., Bertini, E. and Estévez, R. (2013) Expanding the spectrum of megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts in two patients with *GLIALCAM* mutations. *Neurogenetics*. doi:10.1007/s10048-013-0381-x.
- Jeworutzki, E., Lopez-Hernandez, T., Capdevila-Nortes, X., Sirisi, S., Bengtsson, L., Montolio, M., Zifarelli, G., Arnedo, T., Muller, C.S., Schulte,

- U. *et al.* (2012) GlialCAM, a protein defective in a leukodystrophy, serves as a CIC-2 Cl<sup>-</sup> channel auxiliary subunit. *Neuron*, **73**, 951–961.
25. Maduke, M.C. and Reimer, R.J. (2012) Biochemistry to the rescue: a CIC-2 auxiliary subunit provides a tangible link to leukodystrophy. *Neuron*, **73**, 855–857.
  26. Depienne, C., Bugiani, M., Dupuits, C., Galanaud, D., Touitou, V., Postma, N., van Berkel, C., Polder, E., Tollard, E., Darios, F. *et al.* (2013) Brain white matter oedema due to CIC-2 chloride channel deficiency: an observational analytical study. *Lancet Neurol.*, **12**, 659–668.
  27. Drumm, M.L., Wilkinson, D.J., Smit, L.S., Worrell, R.T., Strong, T.V., Frizzell, R.A., Dawson, D.C. and Collins, F.S. (1991) Chloride conductance expressed by delta F508 and other mutant CFTRs in *Xenopus* oocytes. *Science*, **254**, 1797–1799.
  28. Lawson, N.D. and Weinstein, B.M. (2002) In vivo imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish. *Dev. Biol.*, **248**, 307–318.
  29. Cuoghi, B. and Mola, L. (2009) Macroglial cells of the teleost central nervous system: a survey of the main types. *Cell Tissue Res.*, **338**, 319–332.
  30. Decher, N., Lang, H.J., Nilius, B., Bruggemann, A., Busch, A.E. and Steinmeyer, K. (2001) DCPIB is a novel selective blocker of I(Cl<sub>swell</sub>) and prevents swelling-induced shortening of guinea-pig atrial action potential duration. *Br. J. Pharmacol.*, **134**, 1467–1479.
  31. Benfenati, V., Nicchia, G.P., Svelto, M., Rapisarda, C., Frigeri, A. and Ferroni, S. (2007) Functional down-regulation of volume-regulated anion channels in AQP4 knockdown cultured rat cortical astrocytes. *J. Neurochem.*, **100**, 87–104.
  32. Parkerson, K.A. and Sontheimer, H. (2004) Biophysical and pharmacological characterization of hypotonically activated chloride currents in cortical astrocytes. *Glia*, **46**, 419–436.
  33. Clark, S., Jordt, S.E., Jentsch, T.J. and Mathie, A. (1998) Characterization of the hyperpolarization-activated chloride current in dissociated rat sympathetic neurons. *J. Physiol.*, **506**(Pt 3), 665–678.
  34. Makara, J.K., Rappert, A., Matthias, K., Steinhauser, C., Spat, A. and Kettenmann, H. (2003) Astrocytes from mouse brain slices express CIC-2-mediated Cl<sup>-</sup> currents regulated during development and after injury. *Mol. Cell Neurosci.*, **23**, 521–530.
  35. Wang, F., Xu, Q., Wang, W., Takano, T. and Nedergaard, M. (2012) Bergmann glia modulate cerebellar Purkinje cell bistability via Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> uptake. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **109**, 7911–7916.
  36. Cahoy, J.D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L.C., Zamanian, J.L., Christopherson, K.S., Xing, Y., Lubischer, J.L., Krieg, P.A., Krupenko, S.A. *et al.* (2008) A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J. Neurosci.*, **28**, 264–278.
  37. Lovatt, D., Sonnewald, U., Waagepetersen, H.S., Schousboe, A., He, W., Lin, J.H.-C., Han, X., Takano, T., Wang, S., Sim, F.J. *et al.* (2007) The transcriptome and metabolic gene signature of protoplasmic astrocytes in the adult murine cortex. *J. Neurosci.*, **27**, 12255–12266.
  38. Voss, F.K., Ullrich, F., Münch, J., Lazarow, K., Lutter, D., Mah, N., Andrade-Navarro, M.A., von Kries, J.P., Stauber, T. and Jentsch, T.J. (2014) Identification of LRRC8 heteromers as an essential component of the volume-regulated anion channel VRAC. *Science*. doi:10.1126/science.1252826.
  39. Qiu, Z., Dubin, A.E., Mathur, J., Tu, B., Reddy, K., Miraglia, L.J., Reinhardt, J., Orth, A.P. and Patapoutian, A. (2014) SWELL1, a plasma membrane protein, is an essential component of volume-regulated anion channel. *Cell*, **157**, 447–458.
  40. Brosamle, C. and Halpern, M. (2002) Characterization of myelination in the developing zebrafish. *Glia*, **39**, 47–57.
  41. Jeserich, G., Klempahn, K. and Pfeiffer, M. (2008) Features and functions of oligodendrocytes and myelin proteins of lower vertebrate species. *J. Mol. Neurosci.*, **35**, 117–126.
  42. Yin, X., Baek, R.C., Kirschner, D.A., Peterson, A., Fujii, Y., Nave, K.-A., Macklin, W.B. and Trapp, B.D. (2006) Evolution of a neuroprotective function of central nervous system myelin. *J. Cell Biol.*, **172**, 469–478.
  43. Buckley, C.E., Marguerie, A., Alderton, W.K. and Franklin, R.J.M. (2010) Temporal dynamics of myelination in the zebrafish spinal cord. *Glia*, **58**, 802–812.
  44. Jeserich, G. (1981) A morphological and biochemical study of myelin of myelinogenesis in fish brain. *Dev. Neurosci.*, **4**, 373–381.
  45. Chapouton, P., Jagasia, R. and Bally-Cuif, L. (2007) Adult neurogenesis in non-mammalian vertebrates. *BioEssays*, **29**, 745–757.
  46. Kyritsis, N., Kizil, C., Zocher, S., Kroehne, V., Kaslin, J., Freudenreich, D., Iltzsche, A. and Brand, M. (2012) Acute inflammation initiates the regenerative response in the adult zebrafish brain. *Science*, **338**, 1353–1356.
  47. Buckley, C.E., Goldsmith, P. and Franklin, R.J.M. (2008) Zebrafish myelination: a transparent model for remyelination?. *Dis. Model. Mech.*, **1**, 221–228.
  48. Dubois-Dalcq, M., Williams, A., Stadelmann, C., Stankoff, B., Zalc, B. and Lubetzki, C. (2008) From fish to man: understanding endogenous remyelination in central nervous system demyelinating diseases. *Brain*, **131**, 1686–1700.
  49. Rash, J.E. (2010) Molecular disruptions of the panglial syncytium block potassium siphoning and axonal saltatory conduction: pertinence to neuromyelitis optica and other demyelinating diseases of the central nervous system. *Neuroscience*, **168**, 982–1008.
  50. Neusch, C., Rozengurt, N., Jacobs, R.E., Lester, H.A. and Kofuji, P. (2001) Kir4.1 potassium channel subunit is crucial for oligodendrocyte development and in vivo myelination. *J. Neurosci.*, **21**, 5429–5438.
  51. Menichella, D.M., Majdan, M., Awatramani, R., Goodenough, D.A., Sirkowski, E., Scherer, S.S. and Paul, D.L. (2006) Genetic and physiological evidence that oligodendrocyte gap junctions contribute to spatial buffering of potassium released during neuronal activity. *J. Neurosci.*, **26**, 10984–10991.
  52. Branicky, R., Miyazaki, H., Strange, K. and Schafer, W.R. (2014) The voltage-gated anion channels encoded by *clh-3* regulate egg laying in *C. elegans* by modulating motor neuron excitability. *J. Neurosci.*, **34**, 764–775.
  53. Westerfield, M. (2000) *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory use of Zebrafish (Danio Rerio)*, University of Oregon Press, Eugene.
  54. Tang, R., Dodd, A., Lai, D., McNabb, W.C. and Love, D.R. (2007) Validation of zebrafish (*Danio rerio*) reference genes for quantitative real-time RT-PCR normalization. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, **39**, 384–390.
  55. Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, **29**, e45.
  56. Peters, A., Palay, S.L. and de Webster, H.F. (1991) *The Fine Structure of the Nervous System: The Neurons and Their Supporting Cells*. Saunders Company, Philadelphia, USA.
  57. Estevez, R., Schroeder, B.C., Accardi, A., Jentsch, T.J. and Pusch, M. (2003) Conservation of chloride channel structure revealed by an inhibitor binding site in CIC-1. *Neuron*, **38**, 47–59.
  58. Thiemann, A., Grunder, S., Pusch, M. and Jentsch, T.J. (1992) A chloride channel widely expressed in epithelial and non-epithelial cells. *Nature*, **356**, 57–60.
  59. Rinner, O., Rick, J.M. and Neuhaus, S.C.F. (2005) Contrast sensitivity, spatial and temporal tuning of the larval zebrafish optokinetic response. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **46**, 137–142.
  60. Ferroni, S., Marchini, C., Nobile, M. and Rapisarda, C. (1997) Characterization of an inwardly rectifying chloride conductance expressed by cultured rat cortical astrocytes. *Glia*, **21**, 217–227.
  61. Blanz, J., Schweizer, M., Auberson, M., Maier, H., Muenscher, A., Hubner, C.A. and Jentsch, T.J. (2007) Leukoencephalopathy upon disruption of the chloride channel CIC-2. *J. Neurosci.*, **27**, 6581–6589.
  62. Wienholds, E., van Eeden, F., Kusters, M., Mudde, J., Plasterk, R.H. and Cuppen, E. (2003) Efficient target-selected mutagenesis in zebrafish. *Genome Res*, **13**, 2700–2707.

# Identification and characterization of the zebrafish CIC-2 chloride channel orthologs

Carla Pérez-Rius · Héctor Gaitán-Peñas · Raúl Estévez · Alejandro Barrallo-Gimeno

Received: 30 July 2014 / Revised: 9 September 2014 / Accepted: 9 September 2014  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

**Abstract** CIC-2 is a  $\text{Cl}^-$  channel that belongs to the CLC family of chloride channel/transport proteins. CIC-2 molecular role is not clear, and *Clcn2* knockout mice develop blindness, sterility, and leukodystrophy by unknown reasons. CIC-2 is associated in the brain with the adhesion molecule GlialCAM, which is defective in a type of leukodystrophy, involving CIC-2 in the homeostasis of myelin. To get more insight into the functions of CIC-2, we have identified in this work the three CIC-2 orthologs in zebrafish. *clcn2a* and *clcn2b* resulted from the teleost-specific whole genome duplication, while *clcn2c* arose from a gene duplication from *clcn2b*. The expression patterns in adult tissues and embryos of zebrafish *clcn2* paralogs support their subfunctionalization after the duplications, with *clcn2a* being enriched in excitable tissues and *clcn2c* in ionocytes. All three zebrafish *clcn2* proteins interact with human GLIALCAM, that is able to target them to cell junctions, as it does with mammalian CIC-2. We could detect *clcn2a* and *clcn2b* inward rectified chloride currents with different voltage-dependence and kinetics in *Xenopus* oocytes, while *clcn2c* remained inactive. Interestingly, GlialCAM proteins did not modify *clcn2b* inward rectification. Then, our work extends the repertoire of

CIC-2 proteins and provides new tools for structure-function and physiology studies.

**Keywords** CIC-2  $\text{Cl}^-$  channel · In situ hybridization · *Xenopus* oocyte · Genome duplication · Zebrafish · GlialCAM

## Introduction

Chloride is the main anion with biological functions. It is involved in a plethora of roles, such as cell volume regulation, transepithelial fluid movement, muscle contraction, charge compensation, and acidification of intracellular organelles. Cellular chloride levels are actively regulated by different co-transporters, exchangers, and channels [7]. Among them, CIC proteins, which are found in all phyla, in vertebrates constitute a family of proteins divided in two subgroups: one group of intracellular  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$  exchangers with five members, and another group of  $\text{Cl}^-$  channels located at the plasma membrane [22]. This latter group is formed by four members in mammals: CIC-1, expressed in the skeletal muscle and involved in myotonia congenita [29, 48, 49]; CIC-Ka and CIC-Kb, expressed in renal tubules and the inner ear, responsible for some variants of Bartter's syndrome (reviewed in [13]); and CIC-2, broadly expressed in many tissues [51], that has been involved in a leukodystrophy which develops with intramyelinic oedema [6].

CIC proteins function as homodimers [36, 38], and every subunit contains one ion pore [8]. These two ion pores operate independently of each other, but there is a common gating mechanism which affects both pores simultaneously, as first deduced by Miller [39]. Heterologous expression of heterodimeric chloride channels has shown that there are intersubunit interactions that affect individual and common gating [35, 50, 54]. CIC-2 is activated by membrane hyperpolarization, extracellular acidic pH, cell swelling, and an increase in

CPR and HGP contributed equally to this work.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00424-014-1614-z) contains supplementary material, which is available to authorized users.

C. Pérez-Rius · H. Gaitán-Peñas · R. Estévez (✉) ·  
A. Barrallo-Gimeno (✉)  
Departament de Ciències Fisiològiques II, Unitat de Fisiologia,  
Universitat de Barcelona, Carrer Feixa Llarga s/n, L'Hospitalet de  
Llobregat 08907, Barcelona, Spain  
e-mail: restevez@ub.edu  
e-mail: abarrallo@ub.edu

R. Estévez · A. Barrallo-Gimeno  
U750, Centro de Investigación Biológica en Red de Enfermedades  
Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain

intracellular chloride concentration [16, 25]. Despite its broad expression and the relevant attributed functions, the phenotype of the *Cln2* knockout mice is restricted to three aspects: degeneration of photoreceptors in the retina, degeneration of the testes [2], and, later in life, the development of vacuolization of the central nervous system myelin [1]. All of them point to an important unknown role of CIC-2 in regulating ionic concentrations of small extracellular spaces. Other proposed roles of CIC-2, like fluid secretion in salivary glands [40, 46] or in the intestines [4, 56], have been shown to be nonessential in the *Cln2* knockout mice.

Some CIC channels require of specific beta subunits for their proper localization and activity (i.e., CIC-Ka/b and Barttin [10], CIC-7, and Ostm1 [30]). CIC-2 interacts with the cell adhesion molecule GlialCAM, which is responsible for its subcellular localization in glial cells, increases CIC-2-mediated currents, and changes its functional properties [24]. Differently from other CIC subunits, GlialCAM is able to interact not only with CIC-2, but with all CIC channels in vitro and activate them by stabilizing the open configuration of the common gate [23]. *GLIALCAM* is mutated in a rare form of leukodystrophy called megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (MLC) [34]. The absence of GlialCAM in knockout mice leads to the intracellular retention of CIC-2 in glial cells and functional defects in the activity of CIC-2 in oligodendrocytes, proving that the activation of CIC-2 by GlialCAM in vitro is also seen in vivo [18], and suggesting that part of the phenotype of MLC disease is caused by a dysfunction of CIC-2 activity.

Zebrafish is proven as a valuable animal model due to its genetic tractability, not only for embryonic development, as it was originally conceived [17], but also for studying adaptive physiology [21] or reproducing disease phenotypes [32, 43]. We have previously generated a zebrafish MLC model, in which some of the molecular features of the disease are conserved [47]. In this work, we have identified the zebrafish *cln2* orthologous genes, and characterized their expression patterns, subcellular localization, interaction with *GLIALCAM* homologues, and electrophysiological properties in *Xenopus* oocytes.

## Methods

### Animals

Zebrafish were kept at the animal facility in Bellvitge Campus, University of Barcelona, under standard conditions at 28 °C, and 14 h light/10 h dark cycle. Wild-type AB and *tup/lof* lines were used. All experimental procedures conformed to the European Community Guidelines on Animal Care and Experimentation and were approved by animal care and use committees.

### RNA expression

Adult zebrafish or embryos were euthanized using an overdose of tricaine (MS222, Sigma). Adult tissues were quickly dissected and flash-frozen in liquid nitrogen. Total RNA was isolated with TRIzol (Life Technologies) and retrotranscribed using random hexamers with the SuperScript III system (Life Technologies).

The following oligonucleotides pairs were used for qPCR: CCTACAGCCCCACGTTGACT and GGTGGAGAGC TGTTGAGTGA (*cln2a*), TCTCTTCAAGACGCGCTTCA and CGATCAGCCTGTTTCAGATACACA (*cln2b*), and ACGTCTTCGTCGTCCTCTTTG and CAGCACCGATGA CGAAAATG (*cln2c*); and as internal controls: CTGGAG GCCAGCTCAAACAT and ATCAAGAAGAGTAGTACC GCTACCATTAC (*ef1a*), TCTGGAGGACTGTAAGAGGT ATGC and AGACGCACAATCTTGAGAGCAG (*rpl13a*).

qPCR was performed with SYBR Select reagent (Life Technologies) in a StepOne apparatus (Life Technologies). Three experiments were analyzed, with three replicate samples in every experiment. The expression levels were calculated using the comparative  $C_t$  method normalized to the internal control genes. The final results were expressed as the relative messenger RNA (mRNA) levels as indicated in the corresponding figures, taking into account the efficiency of each primer pair with the Pfaffl method [42].

Discrepancies between predicted sequences from the zebrafish genome were solved by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) using the appropriate pairs of primers and RNA from adult brain, using the SuperScript III One-Step RT-PCR with Platinum Taq system (Invitrogen).

### Whole mount in situ hybridization

Fragments of every gene of around 1-kb length were amplified from 7 dpf embryo RNA, cloned into the pGEM-T Easy vector (Promega) and sequenced. The resulting plasmids were linearized and transcribed with the appropriate RNA polymerase to generate antisense riboprobes, labeled with digoxigenin (Roche).

After fixing zebrafish embryos at the desired stages in 4 % paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) overnight at 4 °C, they were dehydrated through a methanol-PBS series and kept at -20 °C until use. Before hybridization, embryos were rehydrated through a PBS-methanol series and then digested with proteinase K for permeabilization, post-fixed with PFA 4 % for 20 min at room temperature (RT), and washed with PBS. Then, they were incubated in hybridization solution (50 % formamide, saline-sodium citrate (SSC) 5×, 2 % Roche blocking powder, 0.1 % Tween, 50 mg/mL heparin, 1 mg/mL yeast RNA, 1 mM EDTA, 0.1 % CHAPS, and DEPC-treated water) at 60 °C overnight. Embryos were hybridized the next day with digoxigenin-labeled

riboprobes and incubated at 60 °C with gentle agitation during 2 days. Unbound riboprobes were washed away using SSC 2× (from SSC 20× stock solution: 3 M NaCl, 0.3 M sodium citrate, pH 7.0) CHAPS 0.1 % for 5 min twice, followed by three more times with SSC 2× CHAPS 0.1 % for 20 min, and finally washed three times with SSC 0.2× CHAPS 0.1 % for 20 min. All these washing steps were performed at 60 °C. Afterwards, we used KTBT (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM KCl, 0.1 % Tween-20) thrice for 5 min at room temperature. Then, we proceeded to add blocking solution (20 % iFBS, 0.7 % Roche blocking powder in KTBT) to avoid unspecific binding of the anti-DIG antibody, agitating for several hours, and then added AP-conjugated anti-DIG antibody (dilution 1:1000), incubating at 6 °C overnight. The next day, we washed embryos with KTBT along the day with numerous solution changes, and kept them overnight with PBS-T (PBS, 0.1 % Tween-20). Then, after washing thrice the embryos with NTMT (100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 0.1 % Tween-20; 1 mM levamisole) for 10 min, staining solution (3 μL/mL NBT, 2.3 μL/mL BCIP in NTMT) was added and kept in the dark at room temperature with gentle agitation until a blue precipitate could be seen. Once the hybridizations were developed, we proceeded to wash embryos twice with PBS-T for 5 min and twice for 30 min, and then stored at 4 °C.

Embryos were photographed on a Nikon SMZ800 stereoscope equipped with a Nikon DS-2Mv digital camera. Images were adjusted for brightness and contrast using NIH ImageJ.

For sectioning, embryos were embedded in a gelatin-albumin-sucrose mixture in PBS for 16 h at 4 °C, then blocks with the embryos at the appropriate orientation were polymerized with glutaraldehyde and post-fixed in PFA 4 % in PBS overnight at 4 °C. Blocks were sectioned at 30-μm thickness in a Leica vibratome, sections floated in PBS and mounted on slides with Mowiol (Calbiochem).

#### Cell line transfection, immunofluorescence, and microscopy

Full-length complementary DNAs (cDNAs) of the three zebrafish *clc-2* channels (Figs. S1 and S2 ESM for *clc-2a* and *b*), plus the human *ClC-2* channel, were cloned into pcDNA3 plasmid vector using the Gateway system (Invitrogen) to add a FLAG or HA tags at their carboxy terminus.

HeLa cells were grown on DMEM containing 10 % (v/v) fetal bovine serum (Sigma) and 1 % penicillin/streptomycin at 37 °C in a humidity controlled incubator with 10 % CO<sub>2</sub>. Cells were transfected with the chloride channels alone or with the human *GLIALCAM* using the TransFectin lipid reagent (BioRad). Twenty four hours after transfection, cells were splitted and transferred into petri dishes with cover glasses, in which experiments were performed after further 24 h. Cells

were fixed with 3 % paraformaldehyde in PBS for 15 min, blocked and permeabilized with 0.1 % Triton X-100 in PBS with 10 % FBS for 2 h at RT. Primary antibodies (anti-Flag 1:500 (Sigma), anti-HA 1:500 (Roche) or anti-*GLIALCAM* 1:100 [34]) were diluted in the same solution and incubated overnight at 4 °C. Cells were washed with the blocking solution and incubated for 2 h at RT with fluorescently labeled secondary antibodies (1:500, Invitrogen), subsequently washed with PBS. Coverslips were mounted in Vectashield medium (Vector Laboratories) with 1.5 μg/mL DAPI (Sigma) and visualized using an Olympus DSU spinning disk confocal microscope.

#### Two-electrode voltage clamp in *Xenopus* oocytes

*Xenopus* oocytes were injected and maintained as described [12]. For all zebrafish *clc-2* channels, 8–10 ng of cRNA were injected in each oocyte. When performing co-expression experiments, 5 ng of cRNA of *glialcama* or *glialcamb* or 2 ng of human *GLIALCAM* were co-injected with the indicated *clc-2* channel. Measurements were done in ND96 medium (96 mM sodium chloride, 2 mM potassium chloride, 1.8 mM calcium chloride, 1 mM magnesium chloride, and 5 mM HEPES buffer at pH 7.4). For selectivity experiments, 80 mM Cl<sup>-</sup> was substituted by equivalent amounts of Br<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>, or NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. For pH experiments, at pH 5.4 or 6.4, HEPES was replaced by 5 mM MES buffer, and at pH 8.4 by 5 mM Tris buffer. The voltage protocol was of an initial 100 ms voltage pulse at -30 mV, followed by 4 s voltage steps from +80 to -140 mV in 20 mV increments, and a tail pulse of 1 s at +40 mV, followed by another 100 ms pulse at -30 mV. The currents were measured using a TEC-05X voltage amplifier and the CellWorks program (npi). Off-line analysis was performed using pClamp9 (Axon Instruments) and SigmaPlot.

In order to compare the currents of *ClC-2*, we used a similar method to the one described in Jeworutzki et al. [23]. Oocytes were first pulsed to +40 mV to estimate the instantaneous activated current under resting conditions and then activated with a long pulse to -140 mV. The following tail pulse to +40 mV induced current deactivation, which can be described with a double exponential kinetics. The ratio between the *I*<sub>min</sub> (resting state currents) and the *I*<sub>max</sub> of the tail pulse indicates the preference of the channel for the open configuration.

## Results

### Identification of the zebrafish repertoire of *clc-2* channels

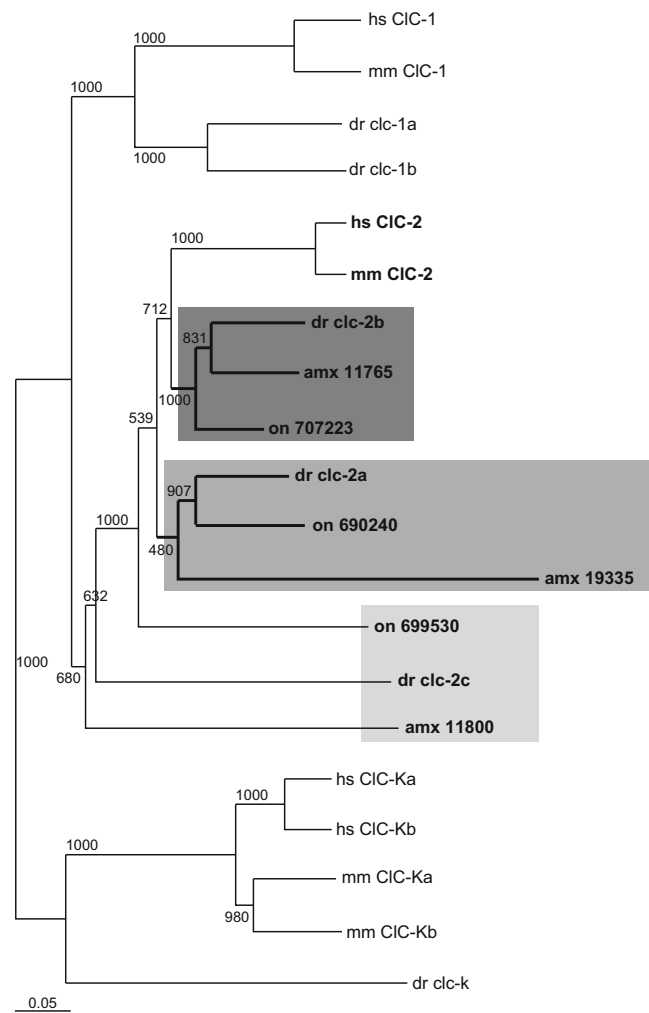
In order to identify the zebrafish *clcn2* orthologs, we inspected the ENSEMBL and NCBI databases. We were surprised to find three orthologous genes instead of the usual two copies,

as is the case for many genes as a result of the teleost-specific genome duplication [19]. We named these genes *clcn2a* (ENSDARG00000062427, located in chromosome 2, NCBI XM\_001920901), *clcn2b* (ENSDARG00000074681, located in a non-assigned scaffold, NCBI XM\_002667675), and *clcn2c* (ENSDARG00000060439, located in chromosome 15, NCBI XM\_686813). We also found three *clcn2* orthologues in two other fish species: the Mexican tetra (*Astyanax mexicanus*) and the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Fig. 1). Therefore, this extra *clcn2* gene is not a zebrafish-specific event.

We noted several differences between the predicted protein sequences of *clcn2a* and *clcn2b* in the ENSEMBL and NCBI databases (Figs. S1 and S2). Neither NCBI nor ENSEMBL had identified the first exon of *clcn2a*. We used several exon prediction programs (geneid, GeneScan), but they failed to recognize a likely exon in 100 kb of genomic sequence upstream of the predicted start codon. Using the conserved peptide RALQYEQTL, present in the first exon of mammalian *CLCN2* and also zebrafish *clcn2b* (see Fig. 2), we performed a BLAST search against the mentioned genomic sequence. We identified a predicted initial exon approximately 58 kb upstream of the originally predicted start site, and whose transcription we confirmed by RT-PCR and sequencing. Furthermore, NCBI prediction for *clcn2a* had a 600 aminoacids insertion at the end of exon 19; we disregarded this sequence, as it had no homology to any CIC protein. Also, NCBI prediction introduced six aminoacids at the beginning of exon 23 (VKTLPR), which we did not find by RT-PCR. On the other hand, the ENSEMBL prediction incorporated a small exon coding for eight aminoacids (EPPFEGNK) between exons 6 and 7 and did not incorporate exon 20; we confirmed by RT-PCR that both of them are alternative exons (in green in Fig. S1).

In the case of *clcn2b*, NCBI prediction did not identify exon 1; there was a four aminoacids insertion at the beginning of exon 8, exons 9 to 12 were not incorporated, and exons 16 and 17 were not correctly spliced (Fig. S2). We could not find exon 20 in our RT-PCR experiments, but given its sequence conservation, we cannot rule out that it is an alternative exon (in green in Fig. S2), as it is in *clcn2a*. All the remaining differences were resolved by RT-PCR (primers available upon request) and sequencing to get the full-length cDNAs of every zebrafish *clcn2* channel, which were obtained by gene synthesis.

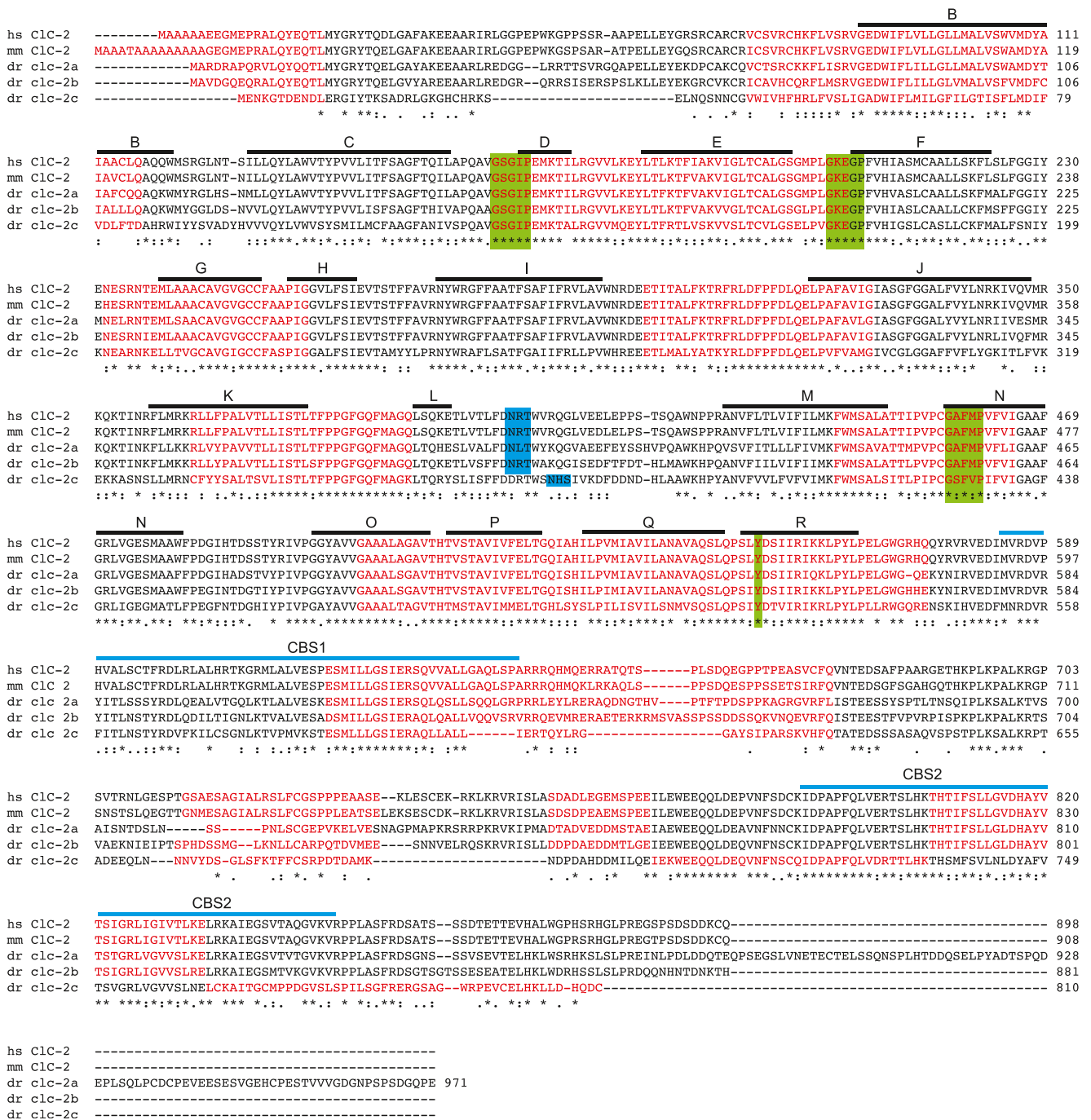
With the definitive protein sequences, we performed a phylogenetic analysis with the other CIC channels belonging to the plasma membrane subfamily, CIC-1 and CIC-Ka/Kb, to assure that the three genes we had found were true CIC-2 orthologues. Of note, zebrafish genome shows two orthologues to CIC-1, but just one to CIC-Ka/Kb, as it was previously described [55]. We aligned the predicted protein sequences using the CLUSTALW program, performed a



**Fig. 1** Phylogenetic analysis of CIC channels of the plasma membrane subfamily shows the triplication of the *clcn2* channel in teleosts. *hs* human, *mm* mouse, *dr* zebrafish (*Danio rerio*), *amx* Mexican tetra (*Astyanax mexicanus*), *on* Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Sequences used for the other two teleosts were ENSAMXG00000011765, ENSAMXG00000011800, and ENSAMXG00000019335 for the Mexican tetra; LOC100690240, LOC100699530, and LOC100707223 for the Nile tilapia.** Numbers in the tree represent bootstrap values

bootstrap analysis with 1000 replicates, and plotted the resulting phylogenetic tree using NJ plot program (Fig. 1). The three teleost *clcn2* paralogs clustered together and with mammalian CIC-2, therefore confirming their identity. *clcn2a* and *b* are more similar to mammalian CIC-2, and the three teleost *clcn2c* are more distantly related, but still unequivocally CIC-2 orthologues.

No obvious synteny was observed with the mouse *Clcn2* gene. Exon-intron boundaries were conserved between mammalian and zebrafish *clcn2* orthologues (Fig. 2). Sequence conservation was high in the 17 predicted intramembrane  $\alpha$ -helices and the intracellular CBS domains, thought to be important for regulation of the channel [11]. The regions involved in the chloride selectivity [8] were perfectly conserved, with the exception of an Ala to Ser change in the



**Fig. 2** Alignment of the predicted protein sequences of human, mouse, and zebrafish Clc-2 channels performed with CLUSTALW.  $\alpha$ -helices are labeled with a black line and named according to Dutzler et al. [8]. CBS intracellular domains are marked with a blue line. Residues involved in

chloride selectivity are highlighted with green background. Consensus glycosylation sequence is highlighted in blue. Exons are typed in alternate black and red colors. Asterisk identical residues among the five proteins, colon conserved residues, full stop similar residues

beginning of helix N in clc-2c. Also, the glycosylation sequence (N-X-S/T) on the extracellular loop between helices L and M is conserved.

Interestingly, although zebrafish *clcn2b* is mapped to a non-assigned genomic scaffold, in the Mexican tetra genome, it is located adjacent to *clcn2c* and the *chordin* gene (scaffold KB882110.1). Zebrafish *clcn2c* is also in close proximity to

*chordin* in chromosome 15. Therefore, it seems likely that zebrafish *clcn2b* would also be next to *clcn2c*. This situation is suggestive of a single-gene duplication event, similar to what happened to Clc-K in mammals [26]. Then, the repertoire of clc-2 channels in teleosts would have arisen from the teleost-specific whole genome duplication to yield clc-2a and b, and an individual gene duplication from clc-2b to originate clc-2c.



## Adult tissue mRNA expression

It has been shown that the evolutionary preservation of duplicated genes often implies their subfunctionalization [15]. One possibility is the restriction of the expression pattern of each gene [31], which in the case of the broadly expressed CIC-2 would be especially suitable. We analyzed the mRNA expression of the three *clcn2* genes in adult tissues. We could observe that *clcn2a* is predominantly expressed in brain and eye (Fig. 3a), while *clcn2b* showed a broader distribution (Fig. 3b), and *clcn2c* was especially abundant in the gills (Fig. 3c). When we compared the expression levels of the three genes in every tissue (Fig. 3d), we could notice that *clcn2a* was the most expressed zebrafish *clcn2* channel in brain, eye, and heart; *clcn2b* in the intestine; and *clcn2c* in gills, kidney, testes, liver, and muscle. This scenario is compatible with a subfunctionalization process, where *clcn2a* is enriched in tissues with high electrical conduction, *clcn2b* is widely expressed as CIC-2 in mammals, and *clcn2c* is more abundant in tissues where ionic exchange with the external medium occurs, like gills and kidney.

## Whole embryo in situ hybridization analysis

We also addressed the expression pattern of the three *clcn2* genes during embryonic development. We cloned 1-kb fragments including 3'UTR from every gene to use as in situ hybridization probes. In the case of *clcn2a*, we could not observe a discrete signal in any stage analyzed (1, 2, 3, and 5 days post-fertilization, dpf), even when we used together

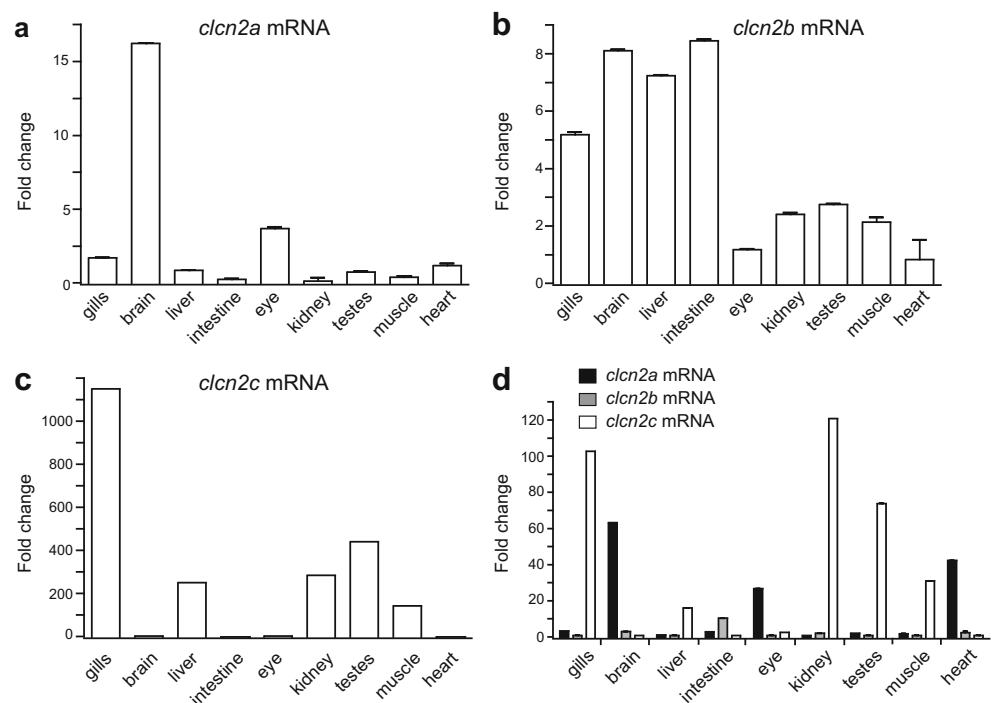
two non-overlapping probes. Only a faint and diffuse staining throughout the whole embryo could be seen (data not shown). For *clcn2b*, we could observe at 26-h postfertilization (hpf) staining in the pronephros of the embryo (Fig. 4a–c), in a region corresponding to the proximal convoluted tubule [37]. We performed a double staining with *clcnk*, expressed in the distal tubule [55], confirming the identity of the pronephric segment where *clcn2b* is expressed.

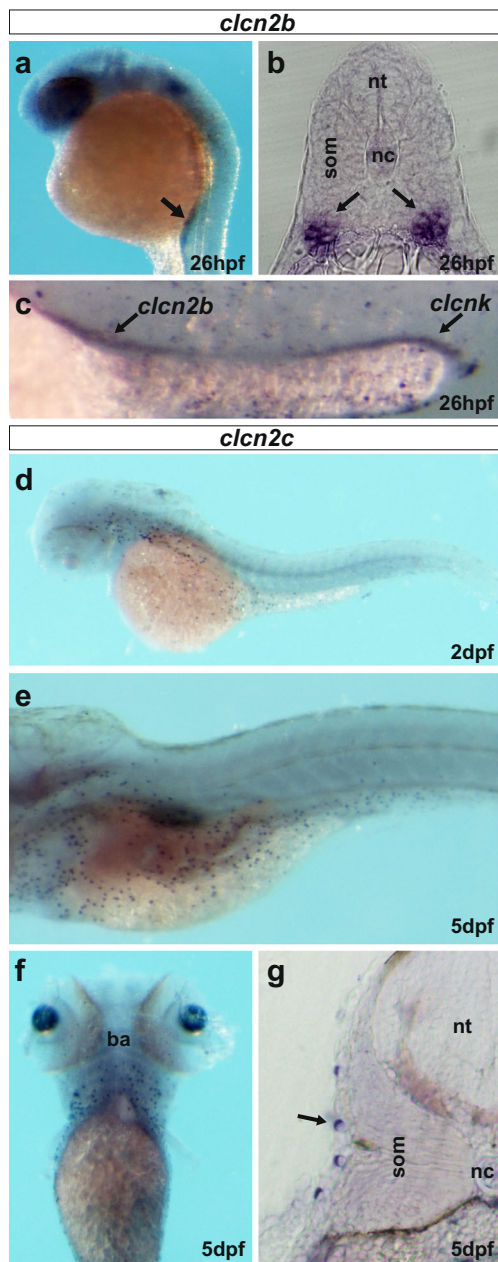
Staining for *clcn2c* was observed starting at 2 dpf as isolated cells on the surface of the embryo posterior to the head and over the yolk (Fig. 4d). The stained cells increased in number and extension covered during the third and posterior days of development, spreading over the yolk and reaching the tip of the yolk extension (Fig. 4e). At 5 dpf, *clcn2c*-positive cells were seen as well in the inferior part of the head, on the branchial arch region (Fig. 4f). Gills will later form in this region, consistent with the high expression levels of *clcn2c* in adult gills. Sectioning allowed visualizing that the cells were indeed restricted to the skin of the embryo (Fig. 4g). This expression pattern is consistent with these cells being ionocytes, skin cells responsible for ionic homeostasis in teleosts [33].

## Human GLIALCAM changes cell localization of zebrafish *clcn2* channels

We have previously shown that the mammalian CIC-2 channel interacts with the cell adhesion molecule GlialCAM that functions as an auxiliary subunit [24]. This interaction increases the plasma membrane localization of the channel,

**Fig. 3** Zebrafish *clcn2* genes expression in adult tissues using real-time PCR. **a** *clcn2a* relative expression, referred to the value in kidney. **b** *clcn2b* relative expression, referred to the value in heart. **c** *clcn2c* relative expression, referred to the value in the heart. **d** Relative expression of the three genes in every tissue. Mean values  $\pm$  standard error





**Fig. 4** Zebrafish embryo in situ hybridization. **a** Lateral view of *clcn2b* expression in the pronephric tubules (arrow) at 26 hpf. **b** Transverse section at the level of the pronephric tubules, showing bilateral expression of *clcn2b*. *som* somite, *nc* notochord, *nt* neural tube. **c** Lateral view of double in situ hybridization with *clcn2b* and *clcnk* probes, showing the expression in the proximal convoluted tubule and the distal tubule, respectively. **d** Lateral view of *clcn2c* expression at 2 dpf, showing expression in isolated cells over the yolk. **e** Same at 5 dpf, *clcn2c* stained cells cover the whole yolk. **f** Ventral view of *clcn2c* expression at 5 dpf in the branchial arches (ba). **g** Transverse section of a 5 dpf embryo at the trunk level showing expression of *clcn2c* in isolated cells in the skin (arrow)

and specially targets the channel to cell junctions, in both cell lines and primary astrocytes. We wanted to check if this interaction is conserved in the zebrafish *clc-2* channels.

As human CIC-2 (Fig. 5a), the three zebrafish *clc-2* channels are mainly localized intracellularly when transfected alone in HeLa cells (Fig. 5d, g, j). When transfected together with human GLIALCAM, zebrafish *clc-2a* and *b* showed a similar behavior as described for human CIC-2: they were targeted to cell junctions (Fig. 5b, e, h white arrows). *clc-2c* was also localized in cell junctions when co-expressed with GlialCAM (Fig. 5k), although with lower efficiency, probably due to its reduced expression levels (Fig. S3).

#### Electrophysiological properties of *clc-2* channels

We expressed in *Xenopus* oocytes every zebrafish *clc-2* paralog and performed two-electrode voltage clamp measurements (Fig. 6a), comparing the activity of uninjected oocytes (Fig. 6b) with that of oocytes expressing human CIC-2 (Fig. 6c). Inwardly rectifying currents were observed for oocytes expressing *clc-2a* (Fig. 6d) and *clc-2b* (Fig. 6e). Interestingly, the activation kinetics of currents at negative voltages were faster in *clc-2a* than in human CIC-2 or *clc-2b* (Fig. 6c–e). Furthermore, rapidly inactivated instantaneous currents at positive voltages were observed for *clc-2a* (Fig. 6d). No currents were seen with *clc-2c* injected oocytes (Fig. 6f).

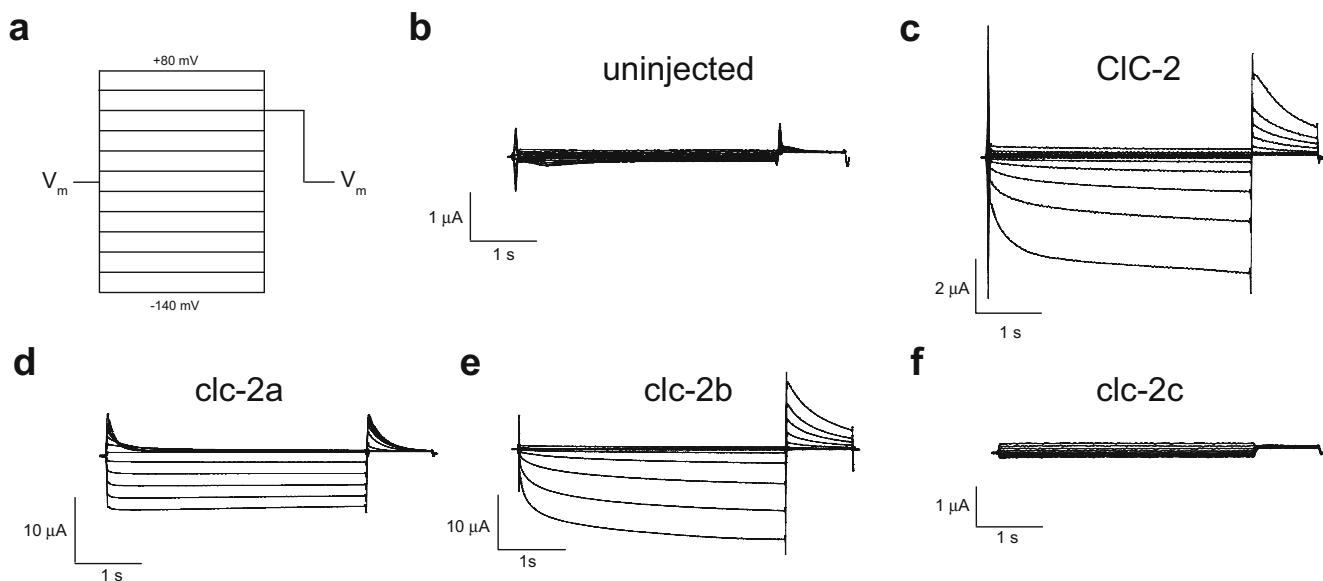
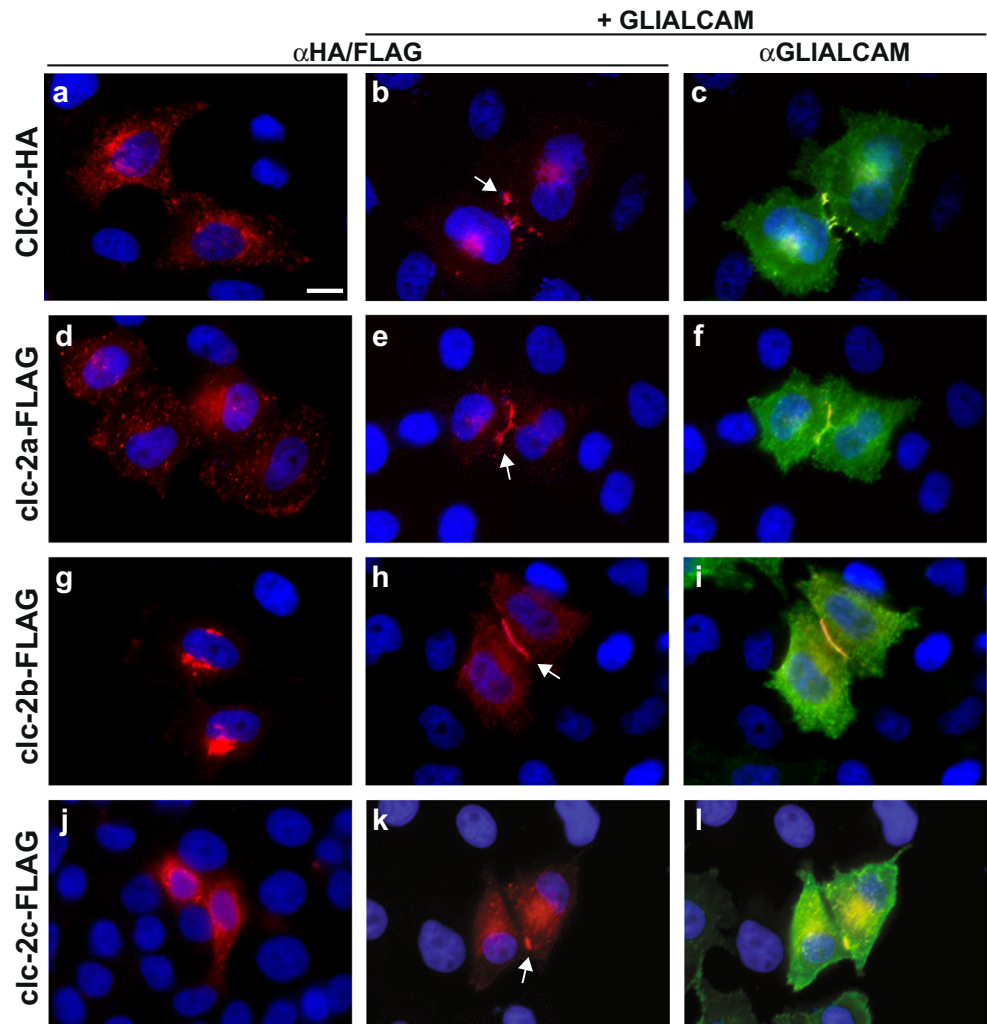
We then compared the effect of human GlialCAM on *clc-2a* and *b* with the effects on human CIC-2 (Fig. 7). As already described for rat CIC-2 [24], co-expression of CIC-2 with human GlialCAM (Fig. 7a, b) increased CIC-2-mediated currents, abolished its rectification at positive voltages (Fig. 7c), and they were instantaneously activated (Fig. 7b). Currents mediated by *clc-2a* and *b* were also slightly increased by GlialCAM (Fig. 7d–i; Table 1). However, whereas GlialCAM changed the rectification of the *clc-2a* channel (Fig. 7f), it remained unaltered in the *clc-2b* channel (Fig. 7i). GlialCAM altered the current characteristics of *clc-2a* but not from *clc-2b*, as assayed by the ratio of resting state currents ( $I_{\min}$ ) and  $I_{\max}$  at +40 mV (see “Methods” section) (Fig. 7j).

We co-expressed *clc-2c* with human GlialCAM or with the zebrafish GlialCAM paralogs [47] but no currents could be detected (data not shown). Co-expression of *clc-2c* with human Barttin [10] also did not result in functional currents (data not shown).

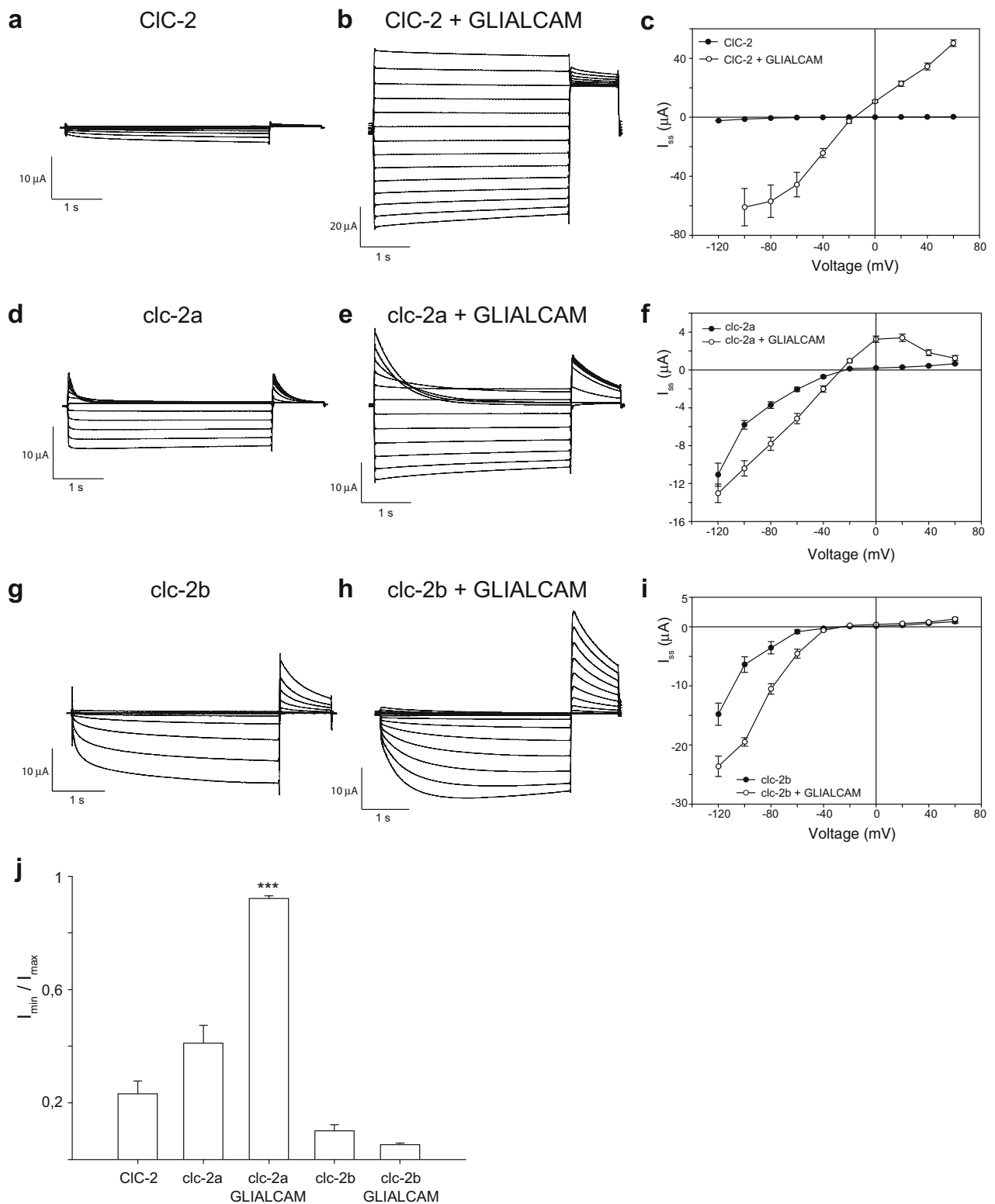
#### Effects of zebrafish GlialCAM orthologs on *clc-2* channels

As we have previously described [47], there are two GlialCAM paralogs (*glialcama* and *glialcamb*) in zebrafish. Similarly to GlialCAM, *glialcama* could be predominantly detected in cell junctions, while *glialcamb* was not, and is probably being retained intracellularly. *Glialcama* was able to modify the current of rat CIC-2, but not *glialcamb* [47]. Then, we co-expressed *glialcama* and *glialcamb* with *clc-2a* (Fig. 8a, b) or *clc-2b* (Fig. 8c, d), and compared their current modification with human GlialCAM.

**Fig. 5** Zebrafish *clc-2* proteins localization in transfected HeLa cells, alone or together with human GLIALCAM. **a–c** Human CIC-2 (*red*) targets to cell junctions (*arrow*) in the presence of human GLIALCAM (*green*). Similar behavior is observed for zebrafish *clc-2a* (**d–f**), *clc-2b* (**g–i**), and *clc-2c* (**j–l**), although for the latter one with lower efficiency. Scale bar 1  $\mu\text{m}$



**Fig. 6** Zebrafish *clc-2*-mediated currents in *Xenopus* oocytes. **a** Voltage clamp protocol. **b** Representative current traces obtained in uninjected oocytes (negative control). Currents mediated by human CIC-2 channel (**c**), *clc-2a* (**d**), *clc-2b* (**e**), and *clc-2c* (**f**)



**Fig. 7** Human GlialCAM effects on the zebrafish clc-2a and b currents in *Xenopus* oocytes. **a** Currents mediated by human CIC-2. **b** Currents mediated by human CIC-2 after coexpression with human GLIALCAM. **c** Representative steady-state current-voltage relationship of human CIC-2 (black,  $n=3$ ) and CIC-2 coexpressed with human GLIALCAM (white,  $n=3$ ). **d–f** Same for zebrafish clc-2a ( $n=16$  for each clc-2a alone and clc-2a plus human GLIALCAM). **g–i** Same for zebrafish clc-2b ( $n=5$  for

each clc-2b alone and clc-2b plus human GLIALCAM). Note that the apparent inactivation observed at negative voltages is an artifact caused by anion depletion, as previously described [24]. **j** GlialCAM alters clc-2a current characteristics as assayed by the ratio of resting state currents ( $I_{min}$ ) and  $I_{max}$  at 40 mV ( $***p<0.001$ ), but not those of clc-2b. Note that clc-2a has a higher ratio than CIC-2 alone, suggesting that clc-2a has a higher preference for the open state than CIC-2

**Table 1** Increase of instantaneous slope conductances ( $\mu\text{S}$ ) by GlialCAM

		Increase $I_{\text{max}}$	$p$ value	$n$
-80 mV	clc-2a	1		16
	clc-2a+hGC	1.66±0.26	**	16
	clc-2a+gca	1.19±0.24	NS	20
	clc-2a+gcb	0.5±0.09	**	15
	clc-2b	1		5
	clc-2b+hGC	1.34±0.28	NS	5
	clc-2b+gca	1.77±0.44	NS	5
	clc-2b+gcb	0.55±0.21	NS	5
+60 mV	clc-2a	1		16
	clc-2a+hGC	7.14±1.25	***	16
	clc-2a+gca	4.26±0.85	***	20
	clc-2a+gcb	0.69±0.1	*	15

hGC human GLIALCAM, gca zebrafish glialcama, gcb zebrafish glialcamb. Values±standard error. NS nonsignificant

\* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$ ; \*\*\* $p<0.001$

Glialcama changed the rectification and the amplitude of clc-2a-mediated currents, in a minor degree compared with human GlialCAM (Fig. 8a; Table 1). Similarly, changes in kinetics of activation and inactivation, at negative and positive voltages, respectively, were also observed for glialcama (Fig. 8). Interestingly, co-expression with glialcamb reduced the currents of clc-2a without changing its functional properties (Fig. 8b; Table 1).

In the case of clc-2b, glialcama co-expression resulted in the same effects seen with human GlialCAM: an increase in currents (Fig. 8c; Table 1) without changing the rectification of the current-voltage relationship. Co-expression with glialcamb also reduced the clc-2b-mediated currents.

As described with rat CIC-2, human GlialCAM did not change the ionic selectivity of clc-2a and b (Fig. 8e, f), which is a conserved feature of CIC proteins. Interestingly, human GlialCAM and glialcama change the pH sensitivity of the clc-2a channel, which indicates that GlialCAM activates the slow gate of clc-2a (Fig. 8g). However, no effect on the pH dependency was seen for clc-2b, suggesting that the clc-2b common gating was not modified by GlialCAM (Fig. 8h) [23]. Definitive proof that the common gating is not modified may need single channel recordings.

## Discussion

Teleost genomes encode three clc-2 channels

In this work, we have described and characterized the full repertoire of clc-2 channels in zebrafish. The first interesting

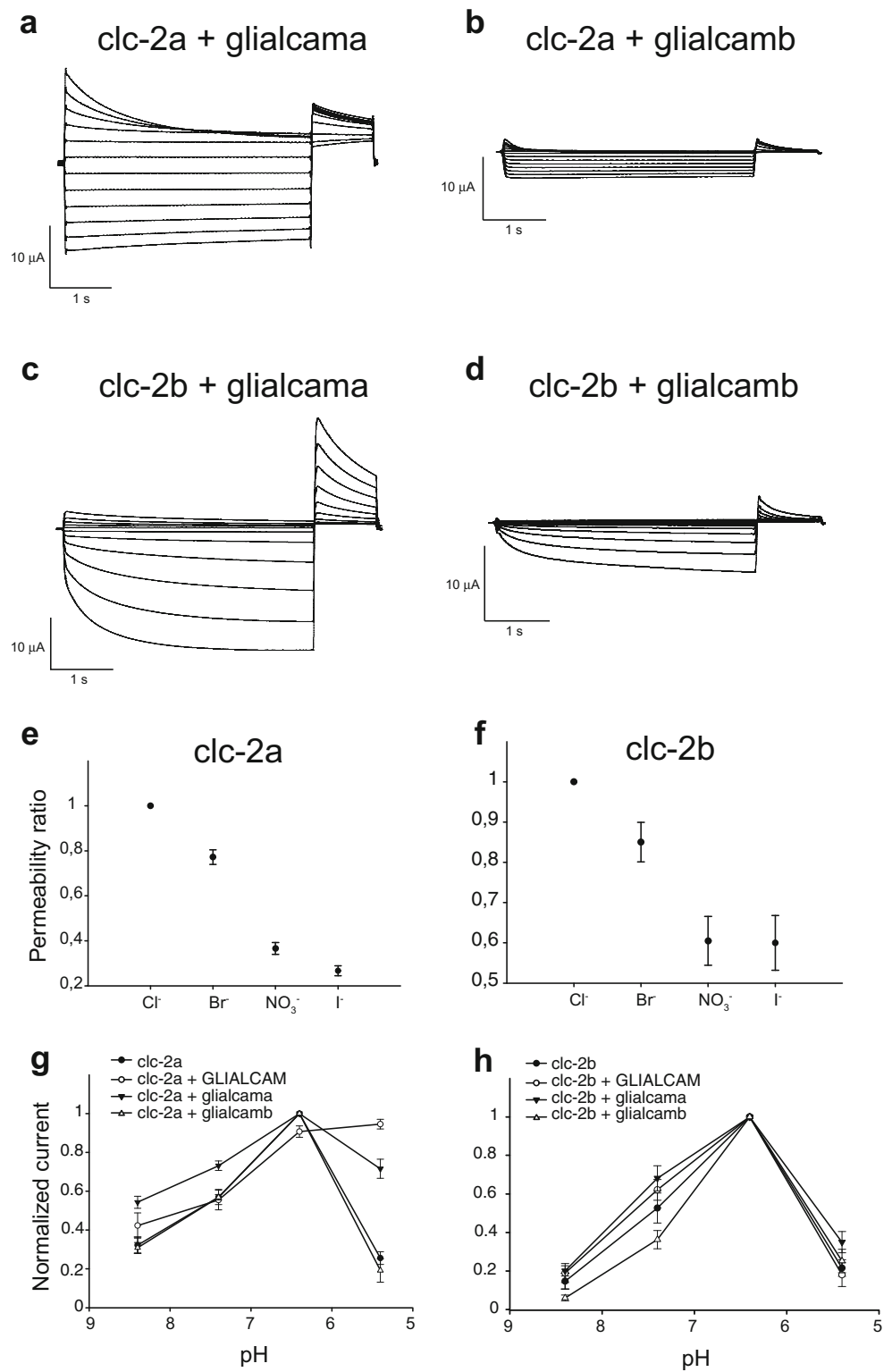
finding was the number of *clcn2* genes in teleost genomes. The teleost fish ancestor experienced an additional whole genome duplication with respect to other vertebrates. This phenomenon has resulted in as many as 15 % of all teleost fish genes to retain two paralogs [19]. After gene duplication, one of the mechanisms leading to gene preservation is subfunctionalization, i.e., the partition of the ancestor expression domains between the paralogs [15].

This seems to be the case for zebrafish *clcn2a* and *clcn2b* genes. These two genes are the most similar in protein sequence to mammalian CIC-2, and the likely result of the whole genome duplication. CIC-2 shows a broad expression pattern, but *clcn2a* is mostly expressed in adult brain, eye, and heart, while *clcn2b* presents a more even expression level in most tissues analyzed. This suggests that *clcn2a* would be more abundant in excitable tissues, where CIC-2-mediated chloride currents could have a role in regulating neuronal excitability [14, 44, 45] or the cardiac pacemaker activity [20]. On the other hand, *clcn2b* would be responsible for the basal chloride currents needed for basic cell functions, still not well understood. During embryonic development, *clcn2b* is expressed in the proximal convoluted tubule of the pronephros, differently from *clcnk*, expressed in the distal tubule. This is analogous to the situation in the mammalian kidney, where CIC-2 is expressed in the proximal tubule [41], and CIC-Ka and CIC-Kb in Henle's loop, convoluted tubule, and collecting duct [27, 28].

The third zebrafish *clcn2* gene (*clcn2c*) arose from a single-gene duplication event, as indicated by its genomic localization in tandem with *clcn2b*. This is not rare, as it can also be seen in the case of aquaporin *aqp8*, present in the zebrafish genome as *aqp8aa* and *aqp8ab* in tandem in chromosome 12 and *aqp8b* in chromosome 3 [52]. *clcn2c* expression is restricted during embryonic development to a teleost-specific cell type, the ionocytes, and in the adult animal is mostly expressed in the gills. This cell type is responsible for ionic homeostasis in both freshwater and saltwater fish [9]. Several types of ionocytes exist, distinguished by the set of ionic channels and transporters they express. One of them is the so-called NCC cell, involved in  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  uptake, and characterized by the expression of the  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  cotransporter NCC-like 2 (slc12a10.2). It has been long hypothesized that these cells must express a basolateral chloride channel. Although the intracellular CIC-3  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$  exchanger has been involved in osmoregulation in other fish [3], *clcn2c* expression pattern fits with the NCC ionocyte distribution [53]. Therefore, clc-2c could be the chloride channel responsible for chloride uptake in teleosts.

Zebrafish clc-2c is the most divergent regarding protein sequence similarity, while keeping the characteristic features of a CIC-2 member, and it was co-opted into a teleost-specific function. The length of the branches in the phylogenetic tree where the three teleost clc-2c channels are located suggests

**Fig. 8** Electrophysiological characterization of the zebrafish clc-2a and b. **a, b** Currents mediated by clc-2a after coexpression with zebrafish glialcama and glialcamb, respectively. **c, d** Currents mediated by clc-2b after coexpression with glialcama and glialcamb, respectively. **e, f** Permeability ratios of clc-2a coexpressed with glialcama ( $n=5 \pm \text{SEM}$ ), and clc-2b coexpressed with glialcama ( $n=5 \pm \text{SEM}$ ). **g, i** pH dependence of clc-2a and clc-2b, each alone or with the different GlialCAM proteins. Currents were normalized to the value at pH 6.4



that, after its duplication, it followed a rapid and independent evolutionary pathway in the three teleost lineages analyzed: Characiformes (Mexican tetra), Perciformes (Nile tilapia), and Cypriniformes (zebrafish), all of them native to freshwater

habitats. It has been described that there are differences in the genes involved in freshwater adaptation even among different populations of the same species [5], which may explain the sequence differences among them.

Interaction of zebrafish *clc-2* channels with GlialCAM

GlialCAM was identified as a CIC-2 and MLC1 subunit in glial cells [24, 34]. In vivo demonstration of its role was clearly defined by the analysis of *GlialCAM*<sup>-/-</sup> mice, in which CIC-2 was mislocalized in the Bergmann glia [18]. However, GlialCAM is able to interact in vitro with all CLC channels tested (CIC-0, CIC-1, and CIC-K/Barttin) [23], including CIC-2 from *Drosophila*, whose genome does not have a GlialCAM ortholog. In this work, we have identified that GlialCAM targets all *clc-2* zebrafish paralogs to cell junctions in cultured cells. GlialCAM not only targets CIC-2 to cell junctions, but also modifies CIC-2 currents. However, putative modification of the common gating was only observed for the *clc-2a* channel, although *clc-2b* currents were slightly increased and no *clc-2c*-mediated currents could be detected. Further work is needed using zebrafish *glialcama*<sup>-/-</sup> animals to address which *clc-2* channels are regulated by *glialcama* in vivo.

In zebrafish, there are two GlialCAM paralogs. However, only *glialcama* is able to target MLC1 and CIC-2 to cell junctions [47]. Although *glialcamb* is mostly located intracellularly in transfected cells, here we show that it is able to interact with CIC-2, as shown by the current reduction when co-expressing with *glialcamb*. This reduction maybe due to a reduced plasma membrane expression of the channel, but further work is needed to prove it. Chimeric analyses between *glialcama* and *glialcamb* could be useful to understand the domains of GlialCAM involved in the interaction with CIC-2.

Zebrafish *clc-2* channels show distinct electrophysiological features

In this work, we have identified a zebrafish CIC-2 homolog (*clc-2a*) which shows some functional properties that have not been identified in other CIC channels, as the extremely fast inactivation at positive voltages and the fast activation at negative voltages. Comparative structure-function studies with this channel could be useful to understand the functional properties of the common gating, which is still poorly understood.

Interestingly, we identified for the first time a CIC channel (*clc-2b*) whose rectification of the current-voltage relationship is not modified by GlialCAM. We believe that structure-function studies with this channel may reveal the CIC-2 protein residues GlialCAM is interacting with.

Finally, we identified a CIC-2 channel (*clc-2c*) that could not be expressed functionally. One reason for this may be the reduced expression levels of this protein, as detected in transient transfection experiments in HeLa cells. Co-expression with GlialCAM or Barttin did not increase chloride currents. Given its teleost-specific function, *clc-2c* may need an unknown stimulus for its activation or, as other CIC channels, may need the interaction with an unknown regulatory subunit to be active.

**Acknowledgments** We would like to thank Beatriz Gamarra and Lara Sedó for excellent fish care. This work was supported in part by SAF 2012–31486 (RE), ELA 2012-014C2B (RE), and AFM Telethon 2012–16305 (RE and ABG). RE was awarded within ERA-NET E-RARE-2 framework by ISCIII through CIBERER and with an Icrea Academia Prize. ABG is a Serra Hunter fellow.

## References

- Blanz J, Schweizer M, Auberson M et al (2007) Leukoencephalopathy upon disruption of the chloride channel CIC-2. *J Neurosci* 27:6581–6589. doi:10.1523/JNEUROSCI.0338-07.2007
- Bosl MR, Stein V, Hubner C et al (2001) Male germ cells and photoreceptors, both dependent on close cell-cell interactions, degenerate upon CIC-2 Cl(-) channel disruption. *EMBO J* 20:1289–1299. doi:10.1093/emboj/20.6.1289
- Bossus M, Charmantier G, Blondeau-Bidet E et al (2013) The CIC-3 chloride channel and osmoregulation in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *J Comp Physiol B* 183:641–662. doi:10.1007/s00360-012-0737-9
- Catalan MA, Flores CA, Gonzalez-Begne M et al (2012) Severe defects in absorptive ion transport in distal colons of mice that lack CIC-2 channels. *Gastroenterology* 142:346–354. doi:10.1053/j.gastro.2011.10.037
- DeFaveri J, Shikano T, Shimada Y et al (2011) Global analysis of genes involved in freshwater adaptation in threespine sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*). *Evolution* 65:1800–1807. doi:10.1111/j.1558-5646.2011.01247.x
- Depienne C, Bugiani M, Dupuits C et al (2013) Brain white matter oedema due to CIC-2 chloride channel deficiency: an observational analytical study. *Lancet Neurol* 12:659–668. doi:10.1016/S1474-4422(13)70053-X
- Duran C, Thompson CH, Xiao Q et al (2010) Chloride channels: often enigmatic, rarely predictable. *Annu Rev Physiol* 72:95–121. doi:10.1146/annurev-physiol-021909-135811
- Dutzler R, Campbell EB, Cadene M et al (2002) X-ray structure of a CIC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature* 415:287–294. doi:10.1038/415287a
- Dymowska AK, Hwang PP, Goss GG (2012) Structure and function of ionocytes in the freshwater fish gill. *Respir Physiol Neurobiol* 184:282–292. doi:10.1016/j.resp.2012.08.025
- Estevez R, Boettger T, Stein V et al (2001) Barttin is a Cl(-) channel beta-subunit crucial for renal Cl(-) reabsorption and inner ear K(+) secretion. *Nature* 414:558–561. doi:10.1038/35107099
- Estevez R, Jentsch TJ (2002) CLC chloride channels: correlating structure with function. *Curr Opin Struct Biol* 12:531–539. doi:10.1016/S0959-440X(02)00358-5
- Estevez R, Schroeder BC, Accardi A et al (2003) Conservation of chloride channel structure revealed by an inhibitor binding site in CIC-1. *Neuron* 38:47–59. doi:10.1016/S0896-6273(03)00168-5
- Fahlke C, Fischer M (2010) Physiology and pathophysiology of CIC-K/Barttin channels. *Front Physiol* 1:155. doi:10.3389/fphys.2010.00155
- Foldy C, Lee SH, Morgan RJ et al (2010) Regulation of fast-spiking basket cell synapses by the chloride channel CIC-2. *Nat Neurosci* 13:1047–1049. doi:10.1038/nn.2609
- Force A, Lynch M, Pickett FB et al (1999) Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* 151:1531–1545
- Grunder S, Thiemann A, Pusch M et al (1992) Regions involved in the opening of CIC-2 chloride channel by voltage and cell volume. *Nature* 360:759–762. doi:10.1038/360759a0

17. Grunwald DJ, Eisen JS (2002) Headwaters of the zebrafish—emergence of a new model vertebrate. *Nat Rev Genet* 3:717–724. doi:10.1038/nrg892
18. Hoegg-Beiler MB, Sirisi S, Orozco IJ et al (2014) Disrupting MLC1, GLIALCAM and CIC-2 interactions in leukodystrophy entails Cl<sup>-</sup> channel dysfunction. *Nat Commun* 5:3475. doi:10.1038/ncomms4475
19. Howe K, Clark MD, Torroja CF et al (2013) The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496:498–503. doi:10.1038/nature12111
20. Huang ZM, Prasad C, Britton FC et al (2009) Functional role of CLC-2 chloride inward rectifier channels in cardiac sinoatrial nodal pacemaker cells. *J Mol Cell Cardiol* 47:121–132. doi:10.1016/j.yjmcc.2009.04.008
21. Hwang PP, Chou MY (2013) Zebrafish as an animal model to study ion homeostasis. *Pflugers Arch* 465:1233–1247. doi:10.1007/s00424-013-1269-1
22. Jentsch TJ (2008) CLC chloride channels and transporters: from genes to protein structure, pathology and physiology. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 43:3–36. doi:10.1080/10409230701829110
23. Jeworutzki E, Lagostena L, Elorza-Vidal E et al (2014) GlialCAM, a CIC-2 Cl<sup>-</sup> channel subunit, activates the slow gate of CIC chloride channels. *Biophys J* 107:1105–1106. doi:10.1016/j.bpj.2014.07.040
24. Jeworutzki E, Lopez-Hernandez T, Capdevila-Nortes X et al (2012) GlialCAM, a protein defective in a leukodystrophy, serves as a CIC-2 Cl<sup>-</sup> channel auxiliary subunit. *Neuron* 73:951–961. doi:10.1016/j.neuron.2011.12.039
25. Jordt SE, Jentsch TJ (1997) Molecular dissection of gating in the CIC-2 chloride channel. *EMBO J* 16:1582–1592. doi:10.1093/emboj/16.7.1582
26. Kieferle S, Fong P, Bens M et al (1994) Two highly homologous members of the CLC chloride channel family in both rat and human kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:6943–6947
27. Kobayashi K, Uchida S, Mizutani S et al (2001) Developmental expression of CLC-K1 in the postnatal rat kidney. *Histochem Cell Biol* 116:49–56
28. Kobayashi K, Uchida S, Mizutani S et al (2001) Intrarenal and cellular localization of CLC-K2 protein in the mouse kidney. *J Am Soc Nephrol* 12:1327–1334
29. Koch MC, Steinmeyer K, Lorenz C et al (1992) The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia. *Science* 257:797–800
30. Lange PF, Wartosch L, Jentsch TJ et al (2006) CIC-7 requires Ostm1 as a beta-subunit to support bone resorption and lysosomal function. *Nature* 440:220–223. doi:10.1038/nature04535
31. Li WH, Yang J, Gu X (2005) Expression divergence between duplicate genes. *Trends Genet* 21:602–607. doi:10.1016/j.tig.2005.08.006
32. Lieschke GJ, Currie PD (2007) Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet* 8:353–367. doi:10.1038/nrg2091
33. Lin LY, Horng JL, Kunkel JG et al (2006) Proton pump-rich cell secretes acid in skin of zebrafish larvae. *Am J Physiol Cell Physiol* 290:C371–C378. doi:10.1152/ajpcell.00281.2005
34. Lopez-Hernandez T, Ridder MC, Montolio M et al (2011) Mutant GlialCAM causes megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts, benign familial macrocephaly, and macrocephaly with retardation and autism. *Am J Hum Genet* 88:422–432. doi:10.1016/j.ajhg.2011.02.009
35. Lorenz C, Pusch M, Jentsch TJ (1996) Heteromultimeric CLC chloride channels with novel properties. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:13362–13366
36. Ludewig U, Pusch M, Jentsch TJ (1996) Two physically distinct pores in the dimeric CIC-0 chloride channel. *Nature* 383:340–343. doi:10.1038/383340a0
37. McCampbell KK, Wingert RA (2013) New tides: using zebrafish to study renal regeneration. *Transl Res* 163:109–122. doi:10.1016/j.trsl.2013.10.003
38. Middleton RE, Pheasant DJ, Miller C (1996) Homodimeric architecture of a CIC-type chloride ion channel. *Nature* 383:337–340. doi:10.1038/383337a0
39. Miller C (1982) Open-state substructure of single chloride channels from Torpedo electroplax. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 299:401–411
40. Nehrke K, Arreola J, Nguyen HV et al (2002) Loss of hyperpolarization-activated Cl<sup>-</sup> current in salivary acinar cells from *Cln2* knockout mice. *J Biol Chem* 277:23604–23611. doi:10.1074/jbc.M202900200
41. Obermuller N, Gretz N, Kriz W et al (1998) The swelling-activated chloride channel CIC-2, the chloride channel CIC-3, and CIC-5, a chloride channel mutated in kidney stone disease, are expressed in distinct subpopulations of renal epithelial cells. *J Clin Invest* 101:635–642. doi:10.1172/JCI1496
42. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45. doi:10.1093/nar/29.9.e45
43. Phillips JB, Westerfield M (2014) Zebrafish models in translational research: tipping the scales toward advancements in human health. *Dis Model Mech* 7:739–743. doi:10.1242/dmm.015545
44. Ratte S, Prescott SA (2011) CIC-2 channels regulate neuronal excitability, not intracellular chloride levels. *J Neurosci* 31:15838–15843. doi:10.1523/JNEUROSCI.2748-11.2011
45. Rinke I, Artmann J, Stein V (2010) CIC-2 voltage-gated channels constitute part of the background conductance and assist chloride extrusion. *J Neurosci* 30:4776–4786. doi:10.1523/JNEUROSCI.6299-09.2010
46. Romanenko VG, Nakamoto T, Catalan MA et al (2008) *Cln2* encodes the hyperpolarization-activated chloride channel in the ducts of mouse salivary glands. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 295:G1058–G1067. doi:10.1152/ajpgi.90384.2008
47. Sirisi S, Folgueira M, Lopez-Hernandez T et al (2014) Megalencephalic Leukoencephalopathy with subcortical Cysts protein 1 regulates glial surface localization of GLIALCAM from fish to humans. *Hum Mol Genet*. doi:10.1093/hmg/ddu231
48. Steinmeyer K, Klocke R, Orland C et al (1991) Inactivation of muscle chloride channel by transposon insertion in myotonic mice. *Nature* 354:304–308. doi:10.1038/354304a0
49. Steinmeyer K, Orland C, Jentsch TJ (1991) Primary structure and functional expression of a developmentally regulated skeletal muscle chloride channel. *Nature* 354:301–304. doi:10.1038/354301a0
50. Stolting G, Fischer M, Fahlke C (2014) CIC-1 and CIC-2 form hetero-dimeric channels with novel protopore functions. *Pflugers Arch*. doi:10.1007/s00424-014-1490-6
51. Thiemann A, Grunder S, Pusch M et al (1992) A chloride channel widely expressed in epithelial and non-epithelial cells. *Nature* 356:57–60. doi:10.1038/356057a0
52. Tingaud-Sequeira A, Calusinska M, Finn RN et al (2010) The zebrafish genome encodes the largest vertebrate repertoire of functional aquaporins with dual paralogy and substrate specificities similar to mammals. *BMC Evol Biol* 10:38. doi:10.1186/1471-2148-10-38
53. Wang YF, Tseng YC, Yan JJ et al (2009) Role of SLC12A10.2, a Na-Cl cotransporter-like protein, in a Cl uptake mechanism in zebrafish (*Danio rerio*). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296:R1650–R1660. doi:10.1152/ajpregu.00119.2009
54. Weinreich F, Jentsch TJ (2001) Pores formed by single subunits in mixed dimers of different CLC chloride channels. *J Biol Chem* 276:2347–2353. doi:10.1074/jbc.M005733200
55. Wingert RA, Selleck R, Yu J et al (2007) The *cdx* genes and retinoic acid control the positioning and segmentation of the zebrafish pronephros. *PLoS Genet* 3:1922–1938. doi:10.1371/journal.pgen.0030189
56. Zdebik AA, Cuffe JE, Bertog M et al (2004) Additional disruption of the CIC-2 Cl<sup>-</sup> channel does not exacerbate the cystic fibrosis phenotype of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mouse models. *J Biol Chem* 279:22276–22283. doi:10.1074/jbc.M309899200





*Don't deny the past you lived*  
*Don't neglect the future you have*  
*- Jinjer*

*The only way to go on is to go on. To say "I can do this" even when you know you can't*  
*- Stephen King*