



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Relació estructura-funció de les proteïnes implicades en la leucoencefalopatia megalencefàlica amb quists subcorticals

Efren Xicoy Espauella

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**RELACIÓ ESTRUCTURA-FUNCIÓ DE LES
PROTEÏNES IMPLICADES EN LA
LEUCOENCEFALOPATIA MEGALENCEFÀLICA
AMB QUISTS SUBCORTICALS**

Programa de Doctorat en Biomedicina

Tesi doctoral:

Efren Xicoy Espauella

Directors:

Dr. Raúl Estévez Povedano

Dr. Ekaitz Errasti Murugarren

Departament de Ciències Fisiològiques

Facultat de Medicina (Campus Bellvitge)

Universitat de Barcelona, 2021

PROGRAMA DE DOCTORAT EN BIOMEDICINA

UNIVERSITAT DE BARCELONA

Memòria presentada per optar al grau de doctor per la Universitat de
Barcelona, 2021

EFREN XICOY ESPAULELLA

L'interessat,

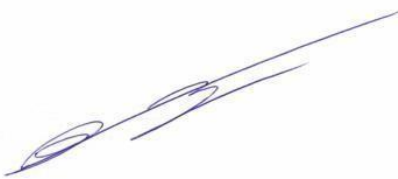
Efren Xicoy Espauella



Els directors de la Tesi,

Dr. Raúl Estévez Povedano

Dr. Ekaitz Errasti Murugarren



Departament de Ciències Fisiològiques, UB

AGRAÏMENTS

Finalment, ha arribat el moment de recordar els quatre anys de Tesi i d'agrair a totes aquelles persones que han format part d'aquesta experiència. Intentaré ser breu, tot i que per sort meva he pogut conèixer moltes persones i m'agradaria que els seus noms estiguin presents en aquesta Tesi perquè si no tinc la sensació que quedaria coixa.

En primer lloc, vull agrair al **Raúl Estévez Povedano** per l'oportunitat de formar part del seu grup i la confiança per deixar-me iniciar aquest projecte d'estructura. Durant aquest temps he pogut aprendre d'una persona totalment vocacional per la ciència que sempre té alguna idea per seguir investigant. Per últim, et volia agrair que tot i les dificultats científiques i sobretot personals que hi han hagut durant la Tesi m'hagis permès realitzar-la en un ambient molt agradable.

Per altra banda, durant tota la meua Tesi he pogut realitzar una col·laboració amb el grup del **Manuel Palacín** en què realment no tinc clar en quin laboratori he passat més hores. **Manuel** muchas gracias por dejarme trabajar en tu laboratorio y sobre todo por hacerme sentir uno más del grupo. Al igual que con Raúl me llevo un gran aprendizaje y sobre todo la pasión con que vivís la ciencia. Finalment, no sé com agrair sense que quedi massa embafador a l'**Ekaitz Errasti Murugarren** per la gran ajuda i suport que has sigut. Has estat amb la persona que mes colze a colze he treballat i probablement la persona que més he trucat (en aquest sentit perdó). Des del principi m'has donat la confiança per poder preguntar els diferents dubtes sobre aquest món d'estructura tan desconegut per mi i tot i els diversos sotracs que ens hem trobat, m'has aportat una bona energia i una inquietud cap a la ciència que m'ha enganxat. Estic molt content que formis part d'aquesta Tesi com a codirector i espero que tu també guardis un bon record al veure-la. Ens veiem per alguna muntanya molt probablement.

Ei ara toca la gent del lab de Bellvitge. Realment, aquí ha estat l'èxit de la Tesi, ja que he tingut la sort de topiar amb uns companys/amics fantàstics. **Mercedes** gràcies per compartir la teua poyata en els meus inicis i t'agraeixo la paciència del principi ensenyant-me com fer un WB i mostrar-me com aguantar sense patir agafada a una

barra de dominades. Em va saber greu que haguessis que deixar el lab, però m'alegro que seguim en contacte i veure que segueixes en ciència i et va bé. Potser no rius tant com amb nosaltres en el nou lab, però em vas dir que és molt bona gent i m'alegro molt per tu. Tot seguit, toca els agraïments als veterans, els PREdocs que vaig veure evolucionar a POSTdocs. **Carla** tot i que vam coincidir poc més d'un any vam poder compartir diversos riures i espero que al lab on estiguis et vagi genial i segueixis tocant la guitarra. **Xabi** amb tu ja he estat gairebé tota la meva Tesi i inclús estic de segon en el teu article d'estructura. Estic molt content d'haver topat i compartit aquests anys amb tu i espero que amb la gent de França estiguis tan a gust com amb la d'aquí, tot i que vam deixar el llistó alt. **Héctor** contigo he compartido muchas cosas des de la música, el deporte, alguna que otra birra e incluso ciencia. Eres una gran persona que aportas muy buen ambiente y da gusto trabajar. Realmente no he podido reír más des de la competición de altura (no tenías nada que hacer, pero bien jugado), imitaciones, el temerario que no mira la puerta (heavy) hasta los varios pulsos de las mojitas (aquí lo tenías más de cara). Eres una gran persona y sé que me llevo un buen amigo y que seguiremos compartiendo KM de carreteras, caminillos, ríos e incluso quizás poyata.

Ara ja toca els PREdocs, dues persones que ha sigut fantàstic conèixer i poder compartir aquests anys. **Adrià** (el hater) el pseudònim havia d'aparèixer. Com el teu referent d'escacs i arracades haig de dir que ets un tio fantàstic que m'ha encantat poder viure conjuntament les nostres Tesis. Gràcies a tu ja sé que Calella de Palafrugell és la bona i el significat de capir i altres paraules catalanes que segurament inventaves. Fora bromes, ets bona persona i estic molt content de tenir-te com amic i no només per la màgia de tiramisú que fas (quin espectacle). Sé que ara estàs una mica ofuscat, però fent referència a l'eslògan d'una de les teves birres preferides sé que allà on vagis triomfaràs. **Marta** la persona amb qui he pogut compartir en paral·lel totes les diferents etapes del doctorat. Són moltíssimes coses i realment no sé ven bé com plasmar-les. Per mi és evident que si hagués d'agrair-te alguna cosa en especial és el gran companyerisme i l'amistat que hem tingut i seguim tenint clar. Hi han hagut moltes birres per desfogar-nos i, tot i la dificultat que és fer una Tesi, hi ha hagut moltes anècdotes, riures i com diu la cançó te mereces una OLA enorme com amiga. Realment ha sigut una sort fer la Tesi amb tu.

Finalment, però per res menys important, les noves incorporacions. **Àida** la nova postdoc del grup, encara que ja portes uns quants anys. Ets una persona que tens caràcter fort, però no pots amagar el bon rotllo i l'humor. Gràcies per les classes magistrals de fotografia i, ara que ja està acabant la Tesi, espero seguir amb les lliçons i fins i tot a veure si em torno a animar a escala amb corda (això serà complicat). **Ash** la ploma de la Franja, estic segur que tots els del lab compartim que guanyes a millor persona. Gràcies per prestar-te sempre a donar un cop de mà amb les maxis, els buffers, la maleïda ultra, etc. És un gust treballar amb tu i córrer (que fàcil ho fas), ja tinc ganes de tornar-hi, però paciència que tinc les cames oxidades. **Laura** la padawan successora. Espero no haver-te cansat massa amb les "breus" explicacions sobre les diferents tècniques i estructura, aquí has demostrat certa paciència i que tota la Tesi et vagi genial, encara que hi ha moments difícils és una bona etapa.

De manera més genèrica, i a causa de la gran quantitat de noms que hauria de anomenar, vull agrair a tota la gent que forma part del grup del IRB, ja que sempre us heu prestat per donar-me un cop de mà i heu fet fàcil que em sentís part del grup. En especial voldria nombrar a certes persones amb les quals he pogut compartir més moments. Empezaré por mi primera vecina de poyata **Sara** que me vio en mi gran inicio y fue testimonio de la frase "dejamos los resultados buenos para mas adelante". Tienes un carácter estupendo y da gusto poder conocer gente como tú. Espero mantener el contacto y te aseguro que ahora que ya veo el final propondré planes de birras y barbacoas, aunque ya no tenga la terraza; i a l'**Alba** i el **Nacho** perquè gràcies al vostre caràcter em vau fer sentir-me ràpidament molt còmode i m'ha agradat molt poder coincidir amb vosaltres.

Els predocs que hem anat a la par. **Paloma Escudero** gracias por prestarte siempre a ayudarme en las diferentes cosas que no llegaba por culpa de estar en dos laboratorios (células, autoclaves, tampones, etc), me hubiera sido imposible. Ahora ya eres doctora y espero que te vaya muy bien. **Adrià**, ets un noi súper dinàmic amb molt bon rotllo, i gràcies per la gran ajuda amb els nanobodies i tots els càlculs (quina tabarra que et vaig donar). Finalment, tot i no ser del grup guai del lab, no em puc deixar a les companyes de passadís **Andrea** i **Isa**. **Andrea** gràcies per intentar-me ensenyar euskera i deixar-me sense dubtar el subjecta falcons, el timer, els diversos permanents, etc. M'ha encantat

coincidir amb tu i com agraïment et vull dir: *Hacer Tesis contigo gustazo ha sido* (ponle tono vasco) i eskerrik asko. Por cierto, nos queda pendiente ir a tu pueblo a córrer y lo importante comer y beber sidra. **Isa** la espanyola infiltrada en Cataluña, tienes un humor genial y me he reído mucho contigo, y como con Andrea, Muchas Gracias (tono Valladolid...). Teniu un caràcter fantàstic, i tot i que les Tesis s'acaben, espero seguir veient-vos.

Per últim, que m'estic allargant, voldria dedicar unes breus paraules als amics fora del lab, ja que sense ells tot seria més complicat i amb menys sentit. En especial volia agrair als amics de la uni **Dani, Anna, Raquel** i **Xavi** per la vostra amistat i perquè sou molt importants per mi. A tota la colla dels **FARTS** que sé que sempre ens tindrem perquè sou com germans i us estimo molt. En especial, volia agrair al **Pauet** perquè ja fa anys que ens coneixem i sempre he pogut comptar amb tu, i ja saps que t'estimo molt. A la colla originària de l'Ipsi el **Viña** i l'**Aleix** per l'amistat que em donen, poder comptar amb ells en qualsevol moment i pel gran suport que suposen per mi, i el **Lluís** que tot i estar viatjant sé que puc comptar amb tu i ja saps que per mi ets com família (torna ja). A la parejita andaluza **Carlos y Paula** con los que me llevo una gran amistad y mil buenos momentos durante estos años. Gracias por todo y tened preparada una silla con un vaso de rebujito en Estados Unidos para cuando venga. Os añoraré mucho. I als del pis verd **Alba, Rosa** i **Bernat** que us heu hagut de menjar tota l'escriptura de Tesi, encara que els viatgets que heu fet crec que us han ajudat. És un *gustàs* haver coincidit amb gent com vosaltres i sé que al final m'acceptareu al pis real on esteu. Gràcies per la vostra nova amistat perquè ho heu fet més fàcil.

Neus segurament deus ser la persona que més ha patit la Tesi, ja que estar al costat d'algú que l'està escrivint sempre és difícil, però si a més li agrada parlar com a mi la cosa ja es torna més complicada. Et volia agrair tot el que has significat per mi durant aquests quatre anys, perquè deixant de banda la Tesi, he hagut de passar per moments molt complicats i realment no sé ben bé com hagués sigut sense algú al meu costat que estimo i m'estima tant. Espero seguir compartint la vida amb tu perquè em fas feliç i perquè l'*ALWAYS* amb tu em sembla poc i és nostre.

Finalment, a totes aquelles persones que m'han estimat i m'han fet sentir estimat des que vaig néixer, la meva família. Gràcies i segueixo donant-vos les gràcies per l'estima

incondicional que sempre he rebut. Estic molt agraït de l'afecte, l'alegria, i tot el que heu i han arribat a fer per mi tot i no ser conscient. Tinc molta sort de tenir-vos, i encara que tinc la sensació que qualsevol paraula que pugui dir se'm queda curta, ús volia dir gràcies i que ús estimo molt. **Sandra** i **Àlex** em sento molt afortunat de tenir-vos com a família i poder compartir viatges, dinars, muntanya i el que vingui. Com a petit de la casa, és evident que he hagut de fixar-me amb vosaltres i us vull agrair el caràcter que teniu i que us estimo molt. La tieta bona, la **Lluïsa** et volia agrair tot el que fas, com ho fas, i que sempre he tingut la teva estima que per mi és molt important.

Mama i **Papa** de veritat que no trobo paraules per transmetre l'agraïment de tot el que heu donat i l'estima rebuda. Gràcies per l'educació donada i sobretot pels valors que ens heu ensenyat. **Mama** ets un pilar importantíssim per mi i la persona que més estimo. Ets forta, dinàmica i tens una alegria que admiro. Sempre estàs allà, sense importar-te si et va bé o no, i estic molt orgullós de poder tenir una mama com tu. **Papa** et vull dedicar aquest treball perquè em vas enganxar la passió i les ganes de fer allò que t'agrada. Sé que estaries o potser ho estàs d'orgullós, però sincerament si poguessis escoltar-me, t'abraçaria per agrair-te com erets, una bona persona i t'agraeixo que ens ensenyessis a ser-ho. T'estimo i sempre sempre estàs amb mi.

ABSTRACT

La Leucoencefalopatia Megalencefàlica amb Quists subcorticals (de l'anglès *Megalencephalic Leukoencephalopathy with subcortical Cysts*, MLC) és un tipus rar de leucodistròfia caracteritzada per la presència de vacuoles en la substància blanca del sistema nerviós. Es suggereix que la patogènesi de la malaltia és causada pel mal funcionament de les cèl·lules glials en el control de l'homeòstasi iònica i el fluid cerebral. Els gens responsables de la malaltia són *MLC1* i *GLIALCAM* que codifiquen per dues proteïnes que reben el mateix nom i que actualment es desconeix la seva funció biològica i la seva estructura. Ambdues proteïnes formen un complex a la membrana plasmàtica que s'expressa principalment en els astròcits que envolten la barrera hematoencefàlica i a la glia de Bergmann del cerebel. Es coneix que aquest complex regula de manera directa a varis canals iònics i transportadors involucrats en el control del flux de ions i de l'aigua en les cèl·lules glials, afectant la seva localització i funció; i indirectament a través de vies de senyalització. El principal objectiu d'aquesta Tesi és augmentar el coneixement estructural d'ambdues proteïnes amb la finalitat d'entendre la seva funció biològica i el mecanisme patològic de la malaltia.

ÍNDIX

ABREVIACIONS	1
ÍNDIX DE TAULES I FIGURES	9
INTRODUCCIÓ	17
1. Leucoencefalopatia Megalencefàlica amb Quists subcorticals (MLC)	19
1.1 Classificació de les leucodistròfies.....	23
1.2 La Leucoencefalopatia Megalencefàlica amb Quists subcorticals (MLC).....	24
1.2.1 Característiques clíniques de la malaltia MLC.....	25
1.2.2 Genètica de la malaltia MLC.....	26
1.2.3 La proteïna MLC1.....	30
1.2.3.1 Estructura de la proteïna MLC1.....	33
1.2.3.2 Mutacions de la proteïna MLC1.....	35
1.3 La proteïna GlialCAM.....	36
1.3.1 Estructura i funció de la proteïna GlialCAM.....	37
1.3.2 Mutacions de la proteïna GlialCAM.....	40
2. Possible funció biològica de la proteïna GlialCAM en l'adhesió cel·lular	45
2.1 Classificació de les CAM.....	46
2.2 Les CAMs en el sistema nerviós central (SNC).....	51
2.3 La superfamília de les immunoglobulines (IgSF).....	54
2.3.1 Característiques estructurals de les molècules CAR(<i>Coxsackievirus-Adenovirus Receptor</i>).....	56
2.3.2 Característiques estructurals de les molècules JAM (<i>Junctional Adhesion Molecules</i>).....	59
3. Possible funció biològica de la proteïna MLC1	63
3.1 Sensors de membrana.....	63
3.1.1 Sensors de ions clorur.....	64
3.1.2 Sensors de ions potassi.....	65
3.1.3 Proteïnes dependents de voltatge.....	66
3.1.3.1 Canals de potassi dependents de voltatge.....	68
3.2 Tetraspanines.....	71
OBJECTIUS	75
MATERIALS I MÈTODES	79
1. Tècniques de biologia molecular	81
1.1 La reacció de PCR.....	81

1.1.1 Reacció de PCR recombinant o mètode SOE (<i>Splicing by Overlap Extension</i>)	83
1.2 Electroforesis del DNA.....	84
1.3 Purificació del DNA.....	85
1.4 Digestió amb enzims de restricció.....	86
1.5 Clonatge de DNA plasmídic.....	86
1.5.1 Clonació clàssica.....	86
1.5.2 Clonació per recombinació mitjançant el sistema <i>Gateway</i> (Invitrogen).....	89
1.5.2.1 Disseny dels oligonucleòtids pel sistema <i>Gateway</i>	90
1.5.2.2 Construcció <i>Entry clone</i> . Reacció BP (attB x attP).....	92
1.5.2.3 Construcció vector destí. Reacció LR (attL x attR).....	93
(a) Reacció LR senzilla.....	94
(b) Reacció LR de <i>Multisite Gateway</i>	94
1.5.2.4 Generació de plàsmids T2A.....	96
1.6 Obtenció de bacteris electrocompetents.....	97
1.7 Transformació de bacteris pel mètode d'electroporació.....	99
1.8 Obtenció i purificació de DNA plasmídic.....	100
1.8.1 Minipreparacions.....	100
1.8.2 Midipreparacions.....	102
1.8.3 Maxipreparacions.....	103
1.9 Quantificació del DNA.....	105
1.10 Seqüenciació del DNA.....	105
2. Tècniques de biologia de proteïnes.....	106
2.1 Obtenció de proteïna total.....	106
2.1.1 Obtenció de proteïna total a partir de cèl·lules adherents HeLa i HEK.....	106
2.1.2 Obtenció de proteïna total de membrana a partir de cèl·lules en suspensió HEK.....	107
2.1.3 Quantificació de la proteïna total.....	109
2.2 Fluorescència d'exclusió per mida (<i>Fluorescence Size Exclusion Chromatography, FSEC</i>).....	110
2.3 Purificació de proteïnes.....	111
2.3.1 Purificació de la proteïna MLC1 utilitzant el <i>tag</i> de 9 histidines.....	112
2.3.2 Purificació de la proteïna MLC1 utilitzant el <i>tag</i> TwinStrep.....	113
2.3.3 Purificació de la proteïna GlialCAM utilitzant el <i>tag</i> 3flag.....	114
2.4 Cromatografia d'exclusió per mida.....	114
2.4.1 Funcionament de l'Akta Pure 25M.....	116
2.5 Resum dels constructes de la proteïna MLC1.....	120
2.6 Western Blot.....	122
2.7 Tractament amb endoglicosilasa F (Endo-F).....	126
2.8 Immunocitoquímica.....	127
2.9 Obtenció de <i>nanobodies</i>	129

2.9.1	Generació de <i>nanobodies</i> (Nb).....	130
2.9.2	Generació de <i>minibodies</i> (Mb)	133
2.10	Citometria de flux.....	135
3.	Línies cel·lulars	137
3.1	Condicions generals de cultiu per cèl·lules adherents HeLa i HEK 293T.....	138
3.1.1	Tripsinització.....	138
3.1.2	Congelació de cèl·lules adherents.....	139
3.1.3	Descongelació de cèl·lules adherents.....	140
3.2	Condicions generals de cultiu per cèl·lules en suspensió HEK 293 6E.....	141
3.2.1	Congelació de cèl·lules en suspensió HEK 2936E.....	141
3.2.2	Descongelació de cèl·lules en suspensió HEK 2936E.....	142
3.3	Transfecció cel·lular.....	143
3.3.1	Transfecció transitòria amb transfectina en cèl·lules adherents HeLa i HEK 293T.....	143
3.3.2	Transfecció transitòria amb polietilenimina HCl max (PEI max) en cèl·lules en suspensió HEK 293 6E.....	144
	RESULTATS	147
1.	Bases moleculars dels mutants de la proteïna GlialCAM localitzats en el domini IgV	149
1.1	Desenvolupament d'un model bioinformàtic de l'homodímer de GlialCAM.....	152
1.2	Estudi dels mutants de GlialCAM identificats en pacients MLC localitzats a la superfície d'interacció cis.....	156
1.3	Model de càrregues de la superfície d'interacció cis localitzat en el domini IgV de la proteïna GlialCAM.....	160
1.4	Estudi dels mutants de la proteïna GlialCAM localitzats a la superfície d'interacció trans.....	161
1.4.1	Generació i caracterització del <i>nanobody</i> 139G1 (Nb 139G1) per estudiar la possible superfície d'interacció trans de la proteïna GlialCAM.....	162
1.4.2	Estudi dels mutants de la proteïna GlialCAM localitzats a la superfície d'interacció trans a través del Nb 139G1.....	163
2.	Bases moleculars dels mutants de la proteïna GlialCAM localitzats en el domini IgC2	169
2.1	Estudi per Cromatografia d'exclusió per mida (de l'anglès <i>Size Exclusion Chromatography</i>) del mutant serina 191 cisteïna (S191C).....	174
2.2	Model bioinformàtic dels homodímers de GlialCAM interaccionant en cis a través del domini IgC2.....	176
3.	Resolució de l'estructura del complex MLC1/GlialCAM	179

3.1 Disseny del constructe per purificar la proteïna MLC1 humana.....	181
3.1.1 Selecció del detergent per purificar la proteïna MLC1.....	182
3.2 Optimització del sistema de purificació de la proteïna MLC1 humana.....	195
3.2.1 Coexpressió de la proteïna MLC1 humana amb la proteïna GlialCAM.....	195
3.2.2 Utilització del detergent <i>Glyco-Diosgenin</i> (GDN) com a substitut de la digitonina.....	197
3.2.3 Optimització de les condicions de purificació amb digitonina.....	199
3.2.4 Purificació del complex MLC1/GlialCAM utilitzant el <i>tag</i> 3flag incorporat a l'extrem C-terminal de la proteïna GlialCAM (GlialCAM-3flag).....	202
3.3 Resultats preliminars de l'estructura del complex MLC1/GlialCAM per criomicroscòpia electrònica (cryo-EM).....	206
DISCUSSIÓ.....	215
CONCLUSIONS.....	231
BIBLIOGRAFIA.....	235
ANNEX: ARTICLES PUBLICATS.....	255

ABREVIATURES

- aa: aminoàcid
- Ab: anticòs (*Antibody*)
- APC: família *amino acids, polyamines and organocations*
- APS: persulfat d'amoni (*Ammonium Persulfate*)
- AQP4: aquaporina 4
- AraC: citosina β -D-arabinofuranosida
- BCA: àcid bicinconínic (*BicinChoninic Acid*)
- BON: *bacterial osmY and nodulation*
- CAR: *coxsackievirus-adenovirus receptor*
- Cf^R: resistència a cloranfenicol
- CHS: *cholesteryl hemisuccinate tris salt*
- CMC: concentració crítica micel·lar (*Critical Micelle Concentration*)
- CNIO: *Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas*
- COPII: *coat protein II*
- Cryo-EM: crio-microscòpia electrònica
- Csp: proteïna emmagatzemador de ions de coure (*Copper storage protein*)
- Cx32: connexina 32
- CY-6: Cymal-6
- C12E8: octaetilè glicol monododecil-éter
- DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol
- DDM: n-Dodecil- β -D-maltopiranòsid
- DGC: complex de distrofina-glicoproteïna (*Dystrophin-Glycoprotein Complex*)
- DM: n-Decil- β -D-maltopiranòsid
- DM thiol: n-Decil- β -D-thiomaltopiranosid
- DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- DMSO: dimetil sulfòxid
- dNTPs: desoxiribonucleòtids
- DTT: *dithiothreitol*

- D1: mutació dominant tipus 1
- D2: mutació dominant tipus 2
- ECRD: domini extracel·lular de repetició de cadherines (Extracellular Cadherin Repeat Domain)
- EC: domini extracel·lular (*Extracellular Domain*)
- EDTA: àcid 2-({2-[bis(carboximetil)amino]etil}(carboximetil)amino)acètic
- EGFR: receptor del factor de creixement epidermal (*Epidermal Growth Factor Receptor*)
- Endo-F: endoglicosilasa F
- FACS: classificació de cèl·lules activades per fluorescència (*Fluorescent Activated Cell Sorting*)
- FBS: sèrum fetal boví (*Fetal Bovine Serum*)
- FSEC: fluorescència de cromatografia d'exclusió per mida (*Fluorescence Size Exclusion Chromatography*)
- GDN: glico-diosgenin
- GFP: proteïna fluorescent verda (*Green Fluorescent Protein*)
- GlialCAM: *glial cell adhesion molecule*
- GPCR: proteïna G acoplada a receptor (*G Protein Coupled Receptors*)
- GPI: glicosilfosfatidilinositol
- hMLC1: proteïna MLC1 humana
- IgCAM: molècula d'adhesió cel·lular de la família de les immunoglobulines (*Immunoglobulin Cell Adhesion Molecule*)
- IgC: domini constant Ig-like
- IgI: domini intermedi Ig-like
- Ig-like: immunoglobulin-like
- IgSF: immunoglobulin superfamily
- IgV: domini variable Ig-like
- JAM: junctional adhesion molecules
- K⁺: ions de potassi
- Kan^R: resistència a kanamicina

- Kbp: proteïna d'unió a K^+ (*binding protein K^+*)
- LAPAO: 3-laurilamina-N,N'-dimetilpropil amina òxid
- LDAO: n-dodecil-N,N-dimetilamina-N-òxid
- LISCB: *Leicester Institute of Structural and Chemical Biology*
- LNX: *ligand of numb protein X*
- LysM: motiu de lisina (*Lysin Motif*)
- MAGI-1b: guanilat quinasa associada a membrana (*Membrane Associated Guanylate kinase*)
- Mb: *minibody*
- MDGA: MAM domain containing glycosylphosphatidylinositol anchor
- ME: matriu extracel·lular
- MLC: Leucoencefalopatia Megalencefàlica amb Quists subcorticals (*Megalencephalic Leukoencephalopathy with subcortical Cysts*)
- MLC2A: fenotip clàssic de MLC causat per mutacions recessives en GlialCAM
- MLC2B: fenotip benigne de MLC causat per mutacions dominants en GlialCAM
- MRI: magnetic resonance imaging
- MUPP-1: multi-PDZ domain protein-1
- Na^{+2} : ions de sodi
- Nb: *nanobody*
- NCAM: molècula d'adhesió cel·lular neuronal (*Neural Cell Adhesion Molecule*)
- NCC: cotransportador de Na^+-Cl^- (*Na^+-Cl^- Cotransporter*)
- Ni-NTA: resina de níquel
- NL: neuroligina
- Nonylglucoside: n-nonil- β -D-glucopiranòsid
- Nonylmaltoside: n-nonil- β -D-maltopiranòsid
- NRX: neuroxina
- Octylglucoside: n-octil- β -D-glucopiranòsid
- PAJs: *Puncta Adherentia Junctions*
- PCR: reacció en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)

- pDEST: vector destí
- PEI: polietilenimina
- pENTR: vector d'entrada (*ENTRy clone*)
- PICK-1: *protein interacting with C kinase 1*
- PNGase-F: pèptid N-glicosilasa F
- PSD-95: *postsynaptic density protein 95*
- RFU: unitats relatives de fluorescència (*Relative Fluorescence Units*)
- RVD: mecanisme de regulació del creixement del volum (*Regulatory Volume Decrease*)
- S: segments TM
- SEC: cromatografia d'exclusió per mida (*Size Exclusion Chromatography*)
- SJ: unions sinàptiques (*Synaptic Junction*)
- SNC: sistema nerviós central
- SNP sistema nerviós perifèric
- SNS: sistema nerviós somàtic
- SNA: sistema nerviós autònom
- SOE: splicing by overlap extension
- TAE: tris-acetate-EDTA
- TBS: tampó Tris-salí (*Tris-Buffered Saline*)
- TEMs: tetraspanin-enriched domains
- TEMED: Tetrametiletildiamina
- TM: transmembrana
- Trp: *transient receptor potential*
- UV: ultravioleta
- VRAC: *volume regulated anion channel*
- VSD: domini que detecta el voltatge (*Voltatge Sensing Domain*)
- WNK: sense lisina (*With No Lsine (K)*)
- WT: nativa (*Wild Type*)

- ZO-1: zona occludens-1
- 2D: dues dimensions
- 3D: tridimensional

ÍNDIX DE FIGURES, IMATGES I TAULES

FIGURES

Figura 1. Representació del flux de ions potassi (K^+) i aigua causat pels potencials d'acció.....	22
Figura 2. Imatges MRI del cervell de pacients MLC.....	24
Figura 3. Representació de la proteïna MLC1.....	30
Figura 4. Immuno-detecció per microscòpia electrònica de la proteïna MLC1 en el romboencèfal.....	31
Figura 5. Model astrocitari de MLC.....	32
Figura 6. Característiques bioquímiques de la proteïna MLC1.....	33
Figura 7. Representació esquemàtica dels motius d'aminoàcids consens identificats en la seqüència primària de la proteïna MLC1.....	35
Figura 8. Colocalització de GlialCAM i MLC1 a les unions astrocitàries.....	37
Figura 9. Representació de la proteïna GlialCAM segons prediccions bioinformàtiques.....	38
Figura 10. Detecció de MLC1 endògena (vermell) en astròcits on s'ha reprimit l'expressió de GlialCAM mitjançant shRNA (de l'anglès small hairpin RNA).....	39
Figura 11. Efecteció de GlialCAM al canal CIC-2.....	40
Figura 12. Representació dels dominis de la proteïna GlialCAM i la posició de les mutacions puntuals.....	41
Figura 13. Immunocitoquímica de cultius primaris d'astròcits analitzant la localització de GlialCAM, MLC1 i CIC-2.....	42
Figura 14. Representació de les diferents unions cel·lulars.....	45
Figura 15. Conformació activa i inactiva de les integrines.....	49
Figura 16. Representació de les selectines.....	50
Figura 17. Representació esquemàtica d'una sinapsi mostrant algunes de les CAMs implicades.....	54
Figura 18. Representació esquemàtica de les molècules CAR, GlialCAM i JAM.....	56
Figura 19. Estructura per cristal·lografia de la regió extracel·lular de la proteïna CAR.	57
Figura 20. Representació de les possibles interaccions de la proteïna CAR a la membrana plasmàtica.....	58
Figura 21. Estructura del dímer JAM1 humana interaccionant a través del domini D1.	60

Figura 22. Característiques estructurals de les quinases WNK.....	65
Figura 23. Estructura de la proteïna Kbp.....	66
Figura 24. Representació esquemàtica de les possibles estructures de sensors de voltatge.....	68
Figura 25. Estructura del canal de potassi KcsA.....	69
Figura 26. Estructura dels canals de potassi Kv.....	70
Figura 27. Estructura tridimensional de la tetraspanina humana CD81.....	73
Figura 28. Representació del model proposat per la regulació de la tetraspanina CD81 amb la proteïna CD19 a través de l'unió amb el colesterol.....	74
Figura 29. Esquema de la recombinació BP.....	93
Figura 30. Esquema de la recombinació LR senzilla.....	94
Figura 31. Esquema de la recombinació LR Multisite.....	96
Figura 32. Representació esquemàtica del procés cel·lular dels constructes amb T2A.	97
Figura 33. Procés de cromatografia d'exclusió per mida.....	115
Figura 34. Anàlisi de la localització a les unions cel·lulars utilitzant el programa imageJ.....	129
Figura 35. Representació de l'estructura d'una immunoglobulina humana i de llama, marcant el domini VHH de l'anticòs que correspondria al nanobody.....	130
Figura 36. Representació del model bioinformàtic del homodímer de GlialCAM.....	153
Figura 37. Estudis de la zona d'interacció cis entre dues molècules de GlialCAM a través de cross-links.....	154
Figura 38. Estudis de la zona d'interacció cis entre dues molècules de GlialCAM a través de glicosilacions.....	155
Figura 39. Assaig de localització a les unions cel·lulars de la proteïna GlialCAM WT i els mutants E86C, E86C/R92Q i E86C/R92W.....	157
Figura 40. Assaig bioquímic de dominància de GlialCAM WT arribant a les unions cel·lulars coexpressat amb els diferents mutants R92.....	158
Figura 41. Assaig de localització a les unions cel·lulars de la proteïna GlialCAM WT i els mutants R92D, R96D i R92D/R96D.....	159
Figura 42. Model de dimerització de la proteïna GlialCAM a través del domini IgV...	160
Figura 43. Estudi de les mutacions dominants MLC2B de tipus D2.....	161

Figura 44. Model de la interacció trans entre dos dimers de la proteïna GlialCAM a través del domini IgV.....	162
Figura 45. Producció del nanobody (Nb) 139G1.....	163
Figura 46. Caracterització del nanobody (Nb) i el minibody (Mb) 139G1 contra la proteïna GlialCAM.....	164
Figura 47. Caracterització del minibody (Mb) 139G1.....	165
Figura 48. Model estructural de les possibles superfícies d'interacció cis i trans entre molècules de GlialCAM a través del domini IgV.....	167
Figura 49. Model bioinformàtic de l'homodímer de GlialCAM indicant els mutants a cisteïnes dels residus localitzats en les dues hèlix α del domini IgC2.....	172
Figura 50. Estudi dels mutants a cisteïnes dels residus de les dues hèlix α del domini IgC2 de la proteïna GlialCAM.....	173
Figura 51. Comparació de la purificació de la proteïna GlialCAM-3flag contra el mutant GlialCAM S191C-3flag.....	175
Figura 52. Representació del model bioinformàtic de la possible xarxa que formen les proteïnes GlialCAM en una mateixa cèl·lula.....	176
Figura 53. WB dels diferents constructes dissenyats per purificar la proteïna MLC1.	182
Figura 54. Perfils de FSEC dels diferents detergents utilitzats per solubilitzar la proteïna hMLC1-3C-GFP-10His.....	185
Figura 55. WB del procés de purificació detectant la proteïna MLC1.....	188
Figura 56. Estudis d'immunocitoquímica dels diferents constructes per purificar la proteïna MLC1.....	189
Figura 57. WB del procés de doble purificació de la proteïna Strep-9His-hMLC1 utilitzant les resina Ni-NTA i Strep-Tactin.....	191
Figura 58. WB del procés de doble purificació de la proteïna Strep-9His-hMLC1 utilitzant les resina Ni-NTA i Strep-Tactin XT.....	193
Figura 59. WB del procés de purificació de la proteïna TwinStrep-hMLC1 utilitzant la resina Strep-Tactin o Strep-Tactin XT.....	194
Figura 60. Purificació de la proteïna TwinStrep-hMLC1 coexpressada o no amb la proteïna GlialCAM-3flag.....	196
Figura 61. Purificació de la proteïna TwinStrep-hMLC1 coexpressada amb la proteïna GlialCAM-3flag.....	198

Figura 62. Quantificació del percentatge de solubilització de la proteïna MLC1 humana amb digitonina.....	200
Figura 63. Purificació de la proteïna TwinStrep-hMLC1 coexpressada amb la proteïna GlialCAM-3flag utilitzant diferents ratios proteïna:detergent.....	201
Figura 64. Purificació de la proteïna TwinStrep-hMLC1 coexpressada amb la proteïna GlialCAM-3flag.....	203
Figura 65. Purificació de la proteïna GlialCAM-3flag utilitzant la resina Flag.....	204
Figura 66. Purificació de la proteïna TwinStrep-hMLC1 coexpressada amb la proteïna GlialCAM-3flag utilitzant 2% de digitonina.....	205
Figura 67. Purificació de la proteïna TwinStrep-hMLC1 coexpressada amb la proteïna GlialCAM-3flag.....	208
Figura 68. Tinció negativa dels tres pics corresponent a una purificació de TwinStrep-hMLC1 coexpressada amb GlialCAM-3flag.....	209
Figura 69. Purificació de la proteïna TwinStrep-hMLC1 coexpressada amb la proteïna GlialCAM-3flag.....	210
Figura 70. Dades obtingudes en el microscopi de 300 kV de Leicester.....	211
Figura 71. Representació de les imatges 2D de Cryo-EM del pic 2 utilitzant el microscopi de 300 Kv.....	212
Figura 72. Classificació dels volums 3D obtinguts a partir dels resultats obtinguts en 2D.....	213
Figura 73. Subclassificació per obtenir volums amb més resolució.....	213
Figura 74. Representació dels volums obtinguts per cryo-EM introduïnt les estructures predites per AlphaFold2.....	214
Figura 75. Alineament de la molècula de GlialCAM.....	218
Figura 76. Representació esquemàtica de les interaccions extracel·lulars de la proteïna GlialCAM.....	219
Figura 77. Representació de les diferents mutacions identificades en el gen MLC1 dels pacients afectats per MLC.....	222
Figura 78. Alineament estructural de les dues parts de la proteïna MLC1.....	222
Figura 79. Alineament estructural dels quatre primers TM de la proteïna MLC1 amb el sensor de voltatge, la proteïna PhoU i la proteïna Csp.....	224
Figura 80. Proposta del model funcional del paper de les diferents proteïnes involucrades en la fisiopatologia de MLC.....	229

IMATGES

Imatge 1. Pantalla del control del sistema de l'AKTA Pure 25M.....	117
Imatge 2. Pantalla del control del sistema de l'AKTA Pure 25M.....	117
Imatge 3. Instal·lació de la columna <i>Superdex 200 Increase 10/300 GL</i> a l'AKTA Pure 25M.....	118
Imatge 4. Pantalla del control del sistema de l'AKTA Pure 25M.....	119
Imatge 5. Pantalla del control del sistema de l'AKTA Pure 25M.....	120

TAULES

Taula 1. Resum de les mutacions del gen MLC1 identificades en pacients MLC.....	27
Taula 2. Resum de les mutacions del gen GLIALCAM identificades en pacients MLC.	29
Taula 3. Representació dels diferents constructes d'entrada de la proteïna MLC1....	121
Taula 4. Representació dels diferents constructes de vector destí de la proteïna MLC1.....	121
Taula 5. Exemple de càlculs a partir dels valors obtinguts per citometria.....	137
Taula 6. Classificació de les mutacions de GlialCAM, localitzades en el domini IgV, identificades en pacients afectats per MLC.....	152
Taula 7. Detergents utilitzats indicant el seu nom complet, la fórmula molecular i la seva estructura química.....	184

INTRODUCCIÓ

L'objectiu principal d'aquesta Tesi és avançar en el coneixement de la fisiopatologia de la Leucoencefalopatia Megalencefàlica amb Quists subcorticals (de l'anglès *Megalencephalic Leukoencephalopathy with subcortical Cysts*, MLC). MLC és un tipus de leucodistròfia rara vacuolitzant que afecta principalment als astròcits, i es causada per mutacions en els gens *MLC1* i *GlialCAM* que codifiquen per dues proteïnes que reben el mateix nom (MLC1 i GlialCAM, respectivament) (van der Knaap et al., 2012). Aquest treball s'ha centrat en el desenvolupament d'eines per obtenir l'estructura, i resoldre la seva funció que realitzen les proteïnes causants de MLC.

La introducció consta de tres capítols. El primer capítol, descriurà el context on es desenvolupa la malaltia, explicant les seves característiques i profunditzant en les proteïnes MLC1 i GlialCAM. El segon capítol, constarà d'una revisió de les molècules d'adhesió, centrant-se en les funcions que realitzen en el sistema nerviós central i, una explicació de l'estructura de molècules d'adhesió similars a la proteïna GlialCAM (CAR i JAM). Finalment, el tercer capítol, es definirà els diferents mecanismes que presenten les proteïnes de membrana per detectar els canvis de voltatge, centrant-nos en les característiques estructurals dels canals de ions dependents de voltatge i les tetraspanines, ja que hipotetitzem que aquestes són les funcions que realitza la proteïna MLC1.

1. LEUCOENCEFALOPATIA MEGALENCEFÀLICA AMB QUISTS SUBCORTICALS (MLC).

El sistema nerviós és una complexa xarxa cel·lular que controla totes les funcions i activitats del nostre organisme. Anatòmicament, dividim el sistema nerviós en dues parts: el Sistema Nerviós Central (SNC) i el Sistema Nerviós Perifèric (SNP).

El SNC està format per l'encèfal (cervell, cerebel i bulb raquidi), la medulla espinal, 12 parells de nervis cranials i 31 parells de nervis espinals. Té la funció de recollir, processar i memoritzar els estímuls externs i interns reaccionant a ells amb impulsos nerviosos.

El SNP està constituït pels nervis perifèrics i els ganglis nerviosos. Segons les característiques d'aquests, el SNP es divideix en: el Sistema Nerviós Somàtic (SNS) i el

Sistema Nervios Autònom (SNA) o vegetatiu. El SNS està format pels nervis sensitius, els nervis motors i els nervis mixtes, els quals estan connectats amb el SNC permetent respondre conscientment als canvis externs. Per altra banda, el SNA és independent del SNC i regula, per si mateix, algunes funcions dels òrgans del cos, l'homeòstasi de l'organisme i funcions vitals com per exemple: la freqüència cardíaca i respiratòria, els moviments intestinals, la secreció àcida de l'estómac, etc. Segons les característiques dels nervis i dels ganglis que conformen el SNA, aquest es divideix en: el sistema parasimpàtic i el sistema simpàtic. Tots dos sistemes intervenen en els mateixos òrgans i en la majoria dels casos la seva funció és antagònica.

El teixit nervios està format per dos tipus cel·lulars: les neurones, involucrades directament en transmetre els impulsos nerviosos i garantir la comunicació entre les diferents parts del cos, i les cèl·lules glials encarregades de dur a terme una gran varietat de funcions indispensables per mantenir l'homeòstasi del sistema nervios. Les cèl·lules glials es subdivideixen en diferents tipus cel·lulars, en el SNC trobem: astròcits, oligodendròcits i cèl·lules ependimals i, en el SNP hi ha les cèl·lules de Schwann mielinitzants i no mielinitzants.

Els oligodendròcits són les cèl·lules responsables de la formació de la mielina en el SNC. La mielina és una prolongació de la membrana plasmàtica dels oligodendròcits que rodeja l'axó. Aquesta superposició de la membrana plasmàtica forma una estructura laminar compacta formada per: capes electrodenses, fruit de membranes fusionades i, capes clares o línies interperiòdiques, degut a la fusió de l'espai extracel·lular (Monje, 2018; van der Knaap & Bugiani, 2017).

La funció de la mielina és permetre una ràpida transmissió de l'impuls nervios gràcies a que proporciona un aïllament elèctric-químic que evita que l'impuls nervios dissipï fora de la neurona. A més, proporciona una integritat estructural i viabilitat als axons i, un suport tròfic a les llargues fibres nervioses, aportant productes de la glicòlisi provinents de la mitocondria (van der Knaap & Bugiani, 2017).

Les beines de mielina es troben situades al llarg de l'axó formant els segments anomenats internodes. Entre internodes hi ha un espai axonal no mielinitzat anomenat Nòdul de Ranvier, on hi ha una elevada concentració de canals i transportadors iònics

que generen els potencials d'acció que van saltant d'un node a l'altre. Aquest procés s'anomena conducció elèctrica saltatòria i permet que la propagació del potencial d'acció es doni de manera ràpida i eficient (Monje, 2018; van der Knaap & Bugiani, 2017).

Els potencials d'acció són impulsos elèctrics que fan servir les neurones per comunicar-se. Quan una neurona rep un estímul es despolaritza, si l'estímul sobrepassa el seu voltatge llindar, s'origina un potencial d'acció que es transmet a la següent neurona. A nivell fisiològic, la despolarització de la neurona provoca la obertura dels canals de sodi del node de Ranvier més pròxim i, per tant l'entrada de ions de sodi. Tot seguit, els canals de sodi s'inactiven i es produeix una sortida compensatòria de ions de potassi a través dels canals de potassi, localitzats en les regions paranodals envoltades per mielina, permetent la repolarització de la membrana. Mentrestant els canals de sodi del següent node de Ranvier s'obriran permetent la transmissió de l'impuls nerviós de manera saltatòria (Raghavan et al., 2019).

El potencial d'acció provoca un flux de ions potassi a l'espai extracel·lular, que és regulat mitjançant dos mecanismes de tamponament: la reabsorció o el transport dels ions potassi cap el torrent sanguini, anomenat tamponament espacial de potassi. El tamponament espacial de potassi consisteix en el transport dels ions potassi cap el torrent sanguini a través d'una xarxa glial formada per: astròcits, oligodendròcits i cèl·lules endotelials. Aquesta xarxa glial presenta diferents canals de potassi que permeten un moviment bidireccional dels ions depenent del seu gradient transmembrana, i està interconnectada mitjançant unions de tipus *gap* que permeten el transport de ions entre cèl·lules adjacents (**figura 1**). La falta de regulació dels ions acompanyat pel moviment osmòtic de l'aigua provoca l'incorrecte funcionament neuronal, la inflamació cel·lular i la formació d'edemes intramielínics (Rash, 2010).

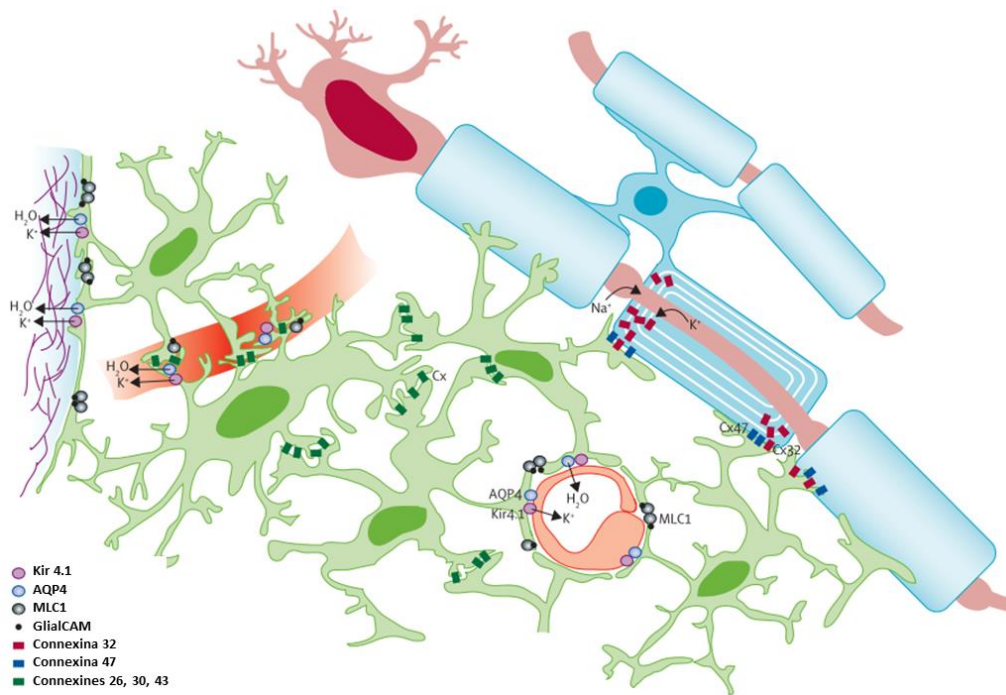


Figura 1. Representació del flux de ions potassi (K^+) i aigua causat pels potencials d'acció. Entrada de ions sodi (Na^+) pels nòduls de Ranvier i sortida de K^+ per la zona paranodal de la membrana plasmàtica de l'axó. Vies intra i intercel·lulars dels K^+ i l'aigua a través de la connexina 32 (Cx32) que uneix les diferents capes de mielina; fins arribar a la xarxa d'astròcits on viatgen a través de les unions gap formades per la Cx32 i la Cx47. Finalment, l'aigua i el K^+ arriben als peus astrocitaris on són alliberats al torrent sanguini a través de l'aquaporina 4 (AQP4) i el canal de potassi Kir 4.1. Les posicions de les proteïnes MLC1 i GlialCAM són indicades en els peus astrocitaris. Adaptació de (van der Knaap et al., 2012).

La substància blanca forma part de la meitat del cervell humà i és un component indispensable per la xarxa neuronal implicada en les operacions motores i cognitives del SN. Està composta per axons mielinitzats, cèl·lules glials (oligodendròcits, cèl·lules progenitores d'oligodendròcits, NG2-glia, astròcits i micròglia) i vasos sanguinis; tot integrat en la matriu extracel·lular (van der Knaap & Bugiani, 2017).

Per tant, la mielina és un component important per la ràpida transmissió de l'impuls nerviós (Monje, 2018). Existeixen una gran varietat de malalties causades per un defecte en la generació o en el desenvolupament de la mielina. Entre aquestes malalties trobem les leucodistròfies (Costello et al., 2009).

1.1 CLASSIFICACIÓ DE LES LEUCODISTRÒFIES.

El terme leucodistròfia prové del grec i significa: leuco (blanc) i distròfia (degeneració). Les leucodistròfies són trastorns hereditaris que afecten a la substància blanca del SNC. Aquests trastorns tenen en comú anormalitats en les cèl·lules glials o en la mielina (Costello et al., 2009).

La classificació clàssica de les leucodistròfies es basa en el mecanisme patològic que efecte a la substància blanca. Divideix les leucodistròfies en 4 categories:

- **Malalties hipomielinitzants:** caracteritzades per la falta permanent de la mielina degut a un defecte en la seva pròpia formació.
- **Malalties desmielinitzants:** inicialment, els individus presenten una disposició normal de la mielina, però amb el temps es produeix degradació d'aquesta.
- **Malalties dismielinitzants:** les persones afectades presenten una disposició anormal de la mielina a nivell estructural o bioquímic.
- **Malalties mielinolítiques:** caracteritzades per una vacuolització de la mielina.

Degut al nou coneixement de la substància blanca que s'ha anat obtenint amb les diferents línies d'investigació, Van der Knaap va realitzar una nova classificació la qual divideix les leucodistròfies en cinc grups (van der Knaap & Bugiani, 2017):

1. **Trastorns de la mielina:** trastorns on els oligodendròcits i la mielina es troben afectats. Es a dir, inclou les malalties: hipomielinitzants, desmielinitzants, dismielinitzants i mielinolítiques.
2. **Astrocitopaties:** els astròcits són les principals cèl·lules afectades o els gens específics dels astròcits són la causa del trastorn.
3. **Leuco-axonopaties:** la degeneració de la substància blanca és causada per una interacció anormal de l'axó amb la glia.

4. **Microgliopaties:** els gens específics de la micròglia són la causa del trastorn.
5. **Leuco-vasculopaties:** defectes genètics de la substància blanca causen una patologia vascular.

Tenint en compte aquestes classificacions, la malaltia MLC és una leucodistrofia mielínolítica i una astricitopatia, caracteritzada per una disfunció de les cèl·lules glials en el control del fluid cerebral i l'homeòstasi iònica (Van der Knaap et al., 2012).

1.2 LA LEUCOENCEFALOPATIA MEGALENCEFÀLICA AMB QUISTS SUBCORTICALS (MLC).

Els primers casos de la malaltia Leucoencefalopatia Megalencefàlica amb Quists subcorticals (MLC) van ser descrits l'any 1991 a Bombay (Índia) en individus que pertanyien al mateix grup ètnic, la comunitat Agrawal (Singhal et al., 1996). A nivell clínic, els individus presentaven megalencefàlia durant el primer any de vida, defectes motors (piramidals i cerebelars), defectes cognitius moderats, convulsions generalitzades i atàxia. En estudis d'imatge de ressonància magnètica (de l'anglès *Magnetic Resonance Imaging*, MRI), els individus presenten una difusió anormal de la substància blanca i la presència de quists subcorticals en les regions temporals, frontal i parietal de les àrees subcorticals del cervell (**figura 2**) (Blattner et al., 2003).

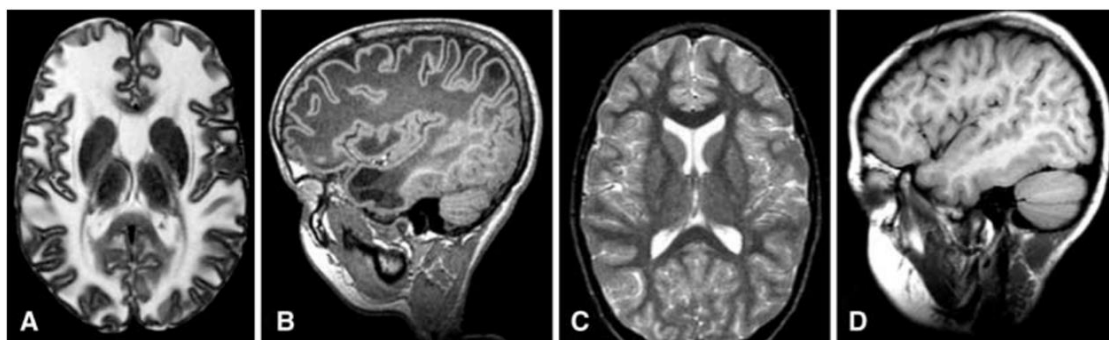


Figura 2. Imatges MRI del cervell de pacients MLC (A i B) comparades amb un control (C i D). A i C) Imatge d'un tall transversal del cervell que mostren una difusió anormal i inflamació de la substància blanca d'un pacient afectat per MLC (**A**) comparat amb un control (**C**). **B i D)** Imatge d'un tall sagittal que mostra la presència de quists subcorticals en la regió anterior-temporal i parietal de la regió subcortical d'un pacient afectat per MLC (**B**) comparat amb un control (**D**) (P. A.J. Leegwater et al., 2002).

Estudis clínics amb famílies afectades per MLC va permetre observar la presència de dos fenotips diferents. Un fenotip clàssic on els pacients no mostraven cap millora en la simptomatologia, i un fenotip benigne on els pacients mostraven una millora de la simptomatologia amb el temps (Van Der Knaap et al., 2010). Tot i així, la simptomatologia inicial entre els dos fenotips era molt similar.

1.2.1 Característiques clíniques de la malaltia MLC.

El diagnòstic per MLC es basa en els següents criteris clínics (Singhal et al., 1996; Topçu et al., 2000):

1. Macrocefàlia durant el primer any de vida. Posteriorment, el creixement del cap resulta normal, arribant a una línia paral·lela al percentil 98.
2. Deteriorament neurològic inexistent o suau durant els primers estadis del desenvolupament, tan a nivell cognitiu com motor.
3. Deteriorament de les funcions motores, atàxia cerebelar i espasticitat durant la infància tardana i adolescència. La capacitat per caminar és limitada i inestable, provocant que la majoria de pacients acabin necessitant cadira de rodes.
4. En períodes més tardans, els pacients presenten anomalies a nivell extrapiramidal, incloent distonia i atetosi i, lleuger retràs mental.
5. Episodis epilèptics presents en la majoria dels pacients controlats amb relativa facilitat. Poden ser provocats per un trauma cranioencefàlic.
6. Difusió i inflamació anormal de la substància blanca cerebral, la substància gris no es mostra alterada.

7. En les estructures centrals com: el cos callós, la càpsula interna i el tronc cerebral la substància blanca es troba millor conservada, tot i que la seva integritat no és total.
8. Presència de quists subcorticals en els regions anterior-temporal i fronto-parietal del cervell.

Encara que la malaltia MLC presenta un patró fenotípic específic, s'observa una gran variabilitat en les manifestacions clíniques que presenten els diferents pacients, inclús entre membres de la mateixa família. Aquesta àmplia variabilitat fenotípica suggereix que tan factors genètics com factors ambientals influencien en la severitat i la progressió de la malaltia (Blattner et al., 2003).

1.2.2 Genètica de la malaltia MLC.

Mitjançant estudis de lligament amb famílies corresponents a una població turca, l'any 2000 es va determinar que el locus del gen MLC estava localitzat en el cromosoma 22q^{tel} (Topçu et al., 2000). Tot seguit, l'any 2001 es va reduir la regió crítica implicada en la malaltia gràcies a estudis que utilitzaven marcadors microsatèl·lits i recombinants en un grup heterogeni de famílies amb MLC. Els gens candidats localitzats a la regió crítica van ser seqüenciats, i es van trobar mutacions en un únic gen, *KIAA0027* o *WKL1* [MIM 604004] que va ser renombrat amb el nom de *MLC1*, ja que era el primer gen implicat en la malaltia MLC (Peter A.J. Leegwater et al., 2001).

El gen *MLC1* està format per 12 exons amb el codó inici localitzat en el segon exó i una regió no codificant a l'extrem 3' de 2,2 kb. S'han descrit dos transcrits alternatius (NM_015166.3 i NM_139292.2) que difereixen en la regió 5' del primer exó, però que resulten en el mateix mRNA (3.435 pb) i codifiquen per la proteïna MLC1 de 377 aminoàcids (Peter A.J. Leegwater et al., 2001).

S'han descrit més de 80 mutacions distribuïdes per tot el gen *MLC1* (taula 1) les quals es troben tan en homozigosi com en heterozigosi. Per altra banda, el gen *MLC1* presenta un efecte fundador en varies poblacions, el més comú es troba en la comunitat Agrawal de la Índia, on tots els pacients presenten un codó stop prematur causat per una inserció d'una cisteïna en la posició 135 (c.135dupC). No hi ha evidències d'una correlació

genotip-fenotip, indicant que no només els factors genètics sinó també els factors ambientals influencien en la malaltia (P. A.J. Leegwater et al., 2002).

REGIÓ	TIPUS DE MUTACIÓ	MUTACIÓ DNA	MUTACIÓ PROTEÏNA	REGIÓ	TIPUS DE MUTACIÓ	MUTACIÓ DNA	MUTACIÓ PROTEÏNA
Exó 2	Deleció	c.109deC	p.Leu37CysfsX21	Exó 5	Puntual	c.373T>C	p.Cys125Arg
Exó 2	Deleció	c.136deT	p.Cys46AlafsX12	Exó 5	Puntual	c.388G>A	p.Gly130Arg
Exó 4	Deleció	c.268_422de	p.Cys90_Gln377 delins38	Exó 5	Puntual	c.422A>G	p.Asn141Ser
Exó 4 i 5	Deleció	c.299_423+10 8del	p.Val100AspfsX 39	Exó 5	Puntual	c.423C>A	p.Asn141Lys
Exó 5	Deleció	c.324delT	p.Asn110ThrfsX 12	Exó 6	Puntual	c.470C>A	p.Ala157Glu
Exó 6	Deleció	c.449_455de	p.Leu150ArgfsX 9	Exó 8	Puntual	c.604G>A	p.Glu202Lys
Exó 6	Deleció	c.514_515de AA	p.Lys172GlufsX8	Exó 8	Puntual	c.629T>A	p.Val210Asp
Exó 7	Deleció	c.594_597de C TCA	p.Tyr198X	Exó 8	Puntual	c.634G>A	p.Gly212Arg
Exó 7	Deleció	c.597_597+33 del	p.Val200SerfsX4	Exó 8	Puntual	c.635G>A	p.Gly212Glu
Exó 10	Deleció	c.793delA	p.Ser265AlafsX20	Exó 9	Puntual	c.733G>C	p.Ala245Pro
Exó 10	Deleció	c.849delC	p.Met284X	Exó 9	Puntual	c.736A>C	p.Ser246Arg
Exó 11	Deleció	c.907_930de	p.Leu307_Leu314de	Exó 10	Puntual	c.806C>A	p.Ser269Tyr
Exó 11	Deleció	c.921_926de	p.Leu309_Leu310de	Exó 10	Puntual	c.809C>G	p.Pro270Arg
Exó 11 i 12	Deleció	c.1059+567*2 192+?de	p.?	Exó 10	Puntual	c.821C>T	p.Thr274Ile
Exó 2	Duplicació	c.111_112dup pGC	p.Gln38ArgfsX21	Exó 10	Puntual	c.823G>A	p.Ala275Thr
Exó 2	Duplicació	c.135dupC	p.Cys46LeufsX34	Exó 10	Puntual	c.824C>A	p.Ala275Asp
Exó 5	Duplicació	c.357dupT	p.Ala120CysfsX61	Exó 10	Puntual	c.832C>T	p.Tyr278His
Exó 6	Duplicació	c.456_460dup p GGAGC	p.Leu154ArgfsX9	Exó 10	Puntual	c.839C>T	p.Ser280Leu
Exó 11	Duplicació	c.927_929dup p GCT	p.Leu310dup	Exó 10	Puntual	c.880C>T	p.Pro294Ser
Exó 5	Inserció + deleció	c.337_353deinsG	p.Ile113GlyfsX4	Exó 11	Puntual	c.959C>A	p.Thr320Lys
Exó 11	Inserció + deleció	c.908_918deinsGCA	p.Val303GlyfsX96	Exó 11	Puntual	c.976T>C	p.Cys326Arg
Exó 2	Puntual	c.65G>A	p.Arg22Gln	Exó 3	No sentit	c.213C>G	p.Tyr71X
Exó 2	Puntual	c.95C>T	p.Ala32Val	Exó 2	Deleció	c.177+1delG	p.?
Exó 2	Puntual	c.178G>A	p.Gly59Glu	Intró 5	Duplicació	c.423+2dup	p.?
Exó 3	Puntual	c.206C>T	p.Ser69Leu	Intró 2	Substitució	c.178-10T>A	p.?
Exó 3	Puntual	c.218G>A	p.Gly73Glu	Intró 5	Substitució	c.423+6T>C	p.?
Exó 3	Puntual	c.235G>A	p.Glu79Lys	Intró 2	<i>Splicing</i>	c.177+1G>T	p.?
Exó 3	Puntual	c.238A>G	p.Met80Val	Intró 3	<i>Splicing</i>	c.267+1G>C	p.?
Exó 3	Puntual	c.240G>A	p.Met80Ile	Intró 3	<i>Splicing</i>	c.268+1G>A	p.?
Exó 3	Puntual	c.249G>T	p.Leu83Phe	Intró 4	<i>Splicing</i>	c.322-1G>A	p.?

Exó 3	Puntual	c.250C>T	p.Arg84Cys	Intró 4	<i>Splicing</i>	c.322-2A>G	p.?
Exó 3	Puntual	c.251G>A	p.Arg84His	Intró 5	<i>Splicing</i>	c.423+1G>A	p.?
Exó 3	Puntual	c.255G>T	p.Cys85Trp	Intró 7	<i>Splicing</i>	c.597+1G>A	p.?
Exó 3	Puntual	c.263G>T	p.Gly88Val	Intró 8	<i>Splicing</i>	c.714+1G>A	p.?
Exó 4	Puntual	c.274C>T	p.Pro92Ser	Intró 9	<i>Splicing</i>	c.772-1G>C	p.?
Exó 4	Puntual	c.278C>T	p.Ser93Leu	Intró 10	<i>Splicing</i>	c.895-1G>C	p.?
Exó 5	Puntual	c.353C>G	p.Thr118Arg	Intró 10	<i>Splicing</i>	c.895-2A>G	p.?
Exó 5	Puntual	c.353C>T	p.Thr118Met	Intró 10	<i>Splicing</i>	c.895-226T>G	p.?
Exó 5	Puntual	c.359C>T	p.Ala120Val	Intró 11	<i>Splicing</i>	c.1060-2A>G	p.?

Taula 1. Resum de les mutacions del gen *MLC1* identificades en pacients MLC. Les mutacions estan escrites utilitzant la nomenclatura estàndard (www.hgvs.org) començant des del codó inici. Adaptació de (van der Knaap et al., 2012).

El 70 – 80 % dels pacients afectats per MLC presenten mutacions en el gen *MLC1* (P. A.J. Leegwater et al., 2002; Wang et al., 2011). Algunes famílies afectades per MLC no presenten mutacions en el gen *MLC1* ni lligament amb el locus del cromosoma 22q_{tel} (Blattner et al., 2003). A més, els pacients mostraven dos fenotips diferents (Van Der Knaap et al., 2010). Aquests fets indicaven una heterogeneïtat genètica en la malaltia MLC, i probablement l'existència d'un altre gen implicat en la malaltia (Peter A.J. Leegwater et al., 2001; Van Der Knaap et al., 2010).

Per determinar el segon gen implicat en MLC, el nostre grup va realitzar anàlisis de proteòmica per identificar possibles proteïnes que estiguessin interaccionant amb *MLC1*. Mitjançant estudis bioquímics, de les diferents proteïnes candidates, es va confirmar que la proteïna GlialCAM interaccionava amb *MLC1*. Amb la col·laboració de la doctora Van der Knaap, es van identificar mutacions en el gen de *GLIALCAM* en pacients afectats per MLC que no presentaven mutacions en *MLC1*. D'aquesta manera, es va confirmar que *GLIALCAM* era el segon gen causant de MLC (López-Hernández, Ridder, et al., 2011).

El gen *HEPACAM* o *GLIALCAM* [MIM 611642] està localitzat en el cromosoma 11q24.2. Està format per 7 exons i una regió no codificant a l'extrem 3'. El gen *GLIALCAM* codifica per la proteïna GlialCAM formada per 416 aminoàcids (Favre-Kontula et al., 2008).

Actualment, hi ha identificades més de 20 mutacions en *GLIALCAM* en pacients afectats per MLC (taula 2). Les mutacions poden ser d'herència recessiva o dominant. Aquest fet ens permet entendre els dos fenotips que observem en pacients afectats per MLC. Els pacients amb mutacions recessives en *GLIALCAM* presenten el fenotip clínic clàssic de MLC que rep el nom de MLC2A. En canvi, els pacients amb mutacions dominants en *GLIALCAM* presenten el fenotip benigne que rep el nom de MLC2B.

REGIÓ	TIPUS DE MUTACIÓ	MUTACIÓ DNA	MUTACIÓ PROTEÍNA	HERÈNCIA
Exó 2	Deleció	c.404_406delAGA	p.Lys135del	Dominant
Exó 3	Deleció	c.461_462delCA	p.Ser154TyrfsX17	Recessiva
Exó 3	Inserció + Deleció	c.580_582delinsTT	p.Leu194PhefsX61	Recessiva
Exó 1	Puntual	c.68T>A	p.Leu23His	Recessiva
Exó 2	Puntual	c.167A>C	p.Gln56Pro	Dominant
Exó 2	Puntual	c.176G>A	p.Ser59Asn	Dominant
Exó 2	Puntual	c.217C>T	p.Arg73Trp	Recessiva
Exó 2	Puntual	c.265G>A	p.Gly89Ser	Dominant
Exó 2	Puntual	c.266G>A	p.Gly89Asp	Dominant
Exó 2	Puntual	c.275G>A	p.Arg92Gln	Recessiva
Exó 2	Puntual	c.274C>T	p.Arg92Trp	Dominant
Exó 2	Puntual	c.292C>T	p.Arg98Cys	Recessiva
Exó 2	Puntual	c.382G>A	p.Asp128Asn	Dominant
Exó 3	Puntual	c.442C>T	p.Pro148Ser	Recessiva
Exó 3	Puntual	c.587C>A	p.Ser196Tyr	Recessiva
Exó 3	Puntual	c.631G>A	p.Asp211Asn	Recessiva
Exó 2	No sentit	c.166C>T	p.Glu56X	Recessiva
Exó 2	No sentit	c.298C>T	p.Arg100X	Recessiva
Exó 4	No sentit	c.789G>A	p.Trp263X	Recessiva

Taula 2. Resum de les mutacions del gen *GLIALCAM* identificades en pacients MLC. Les mutacions estan escrites utilitzant la nomenclatura estàndard (www.hgvs.org) començant des del codó inici. Adaptació de (van der Knaap et al., 2012).

En el dia d'avui, no s'han identificat mutacions causants de MLC en altres gens que no siguin MLC1 o *GLIALCAM*. Tot i així, s'han identificat pacients afectats per MLC (2%) que no presenten cap mutació en MLC1 o *GLIALCAM*. Tenint en compte aquests fets, podria ser que hagués un tercer gen causant de la malaltia MLC.

1.2.3 La proteïna MLC1.

La proteïna MLC1 és una proteïna de membrana codificada pel gen *MLC1*. Està formada per 377 aminoàcids i presenta un pes molecular aproximadament de 41 kDa.

Actualment, es desconeix l'estructura de MLC1. A través de prediccions bioinformàtiques s'ha establert que MLC1 està formada per 8 dominis transmembrana (TM) units per 4 dominis (*loops*) extracel·lulars curts (5-8 aminoàcids) i 3 dominis (*loops*) intracel·lulars, dos d'ells curts (7-9 aminoàcids) i un llarg (31 aminoàcids) entre els TM 4 i 5. Els extrems N i C-terminals són curts i intracel·lulars (Peter A.J. Leegwater et al., 2001) (figura 3).

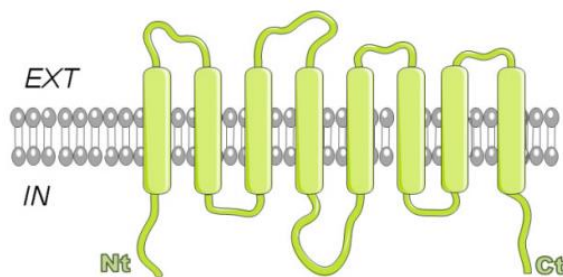


Figura 3. Representació de la proteïna MLC1. Segons prediccions bioinformàtiques, MLC1 consta de 8 domini transmembrana, 4 *loops* extracel·lulars, 3 *loops* intracel·lulars i els extrems N- i C-terminals són intracel·lulars.

La proteïna MLC1 no es troba present en tots els fílums, sinó que es comença a expressar en els cordats que presenten mielina. L'alineament de diferents ortòlegs de MLC1 ens permet observar que els aminoàcids dels dominis TM i de l'extrem C-terminal estan altament conservats. En canvi, els aminoàcids de l'extrem N-terminal presenten una alta variabilitat.

S'han realitzat varis estudis d'immunohistoquímica amb l'objectiu de definir la localització de la proteïna MLC1, tant en teixit de cervell de ratolí com en cervell humà (Ambrosini et al., 2008; Boor et al., 2005; Duarri et al., 2008, 2011). MLC1 s'expressa principalment en la glia de Bergman del cerebel, en les cèl·lules endodials que rodegen els ventricles i en els astròcits localitzats al voltant de les regions subpial i perivascular. No es troba expressió ni en els oligodendròcits ni en la micròglia. Estudis inicials van determinar expressió de MLC1 en les neurones (Teijido et al., 2004), però estudis amb un model *knockout* de MLC1 van demostrar que la senyal dels anticossos utilitzats contra MLC1 era inespecífica (Hoegg-Beiler et al., 2014).

Estudis de microscòpia electrònica d'alta resolució (*immunogold*) en teixit humà confirmen la localització de MLC1 en les unions astròcitàries a zones perivasculars, però no a les unions entre astròcit i cèl·lula endotelial (Duarri et al., 2011; Teijido et al., 2007) (**figura 4**).

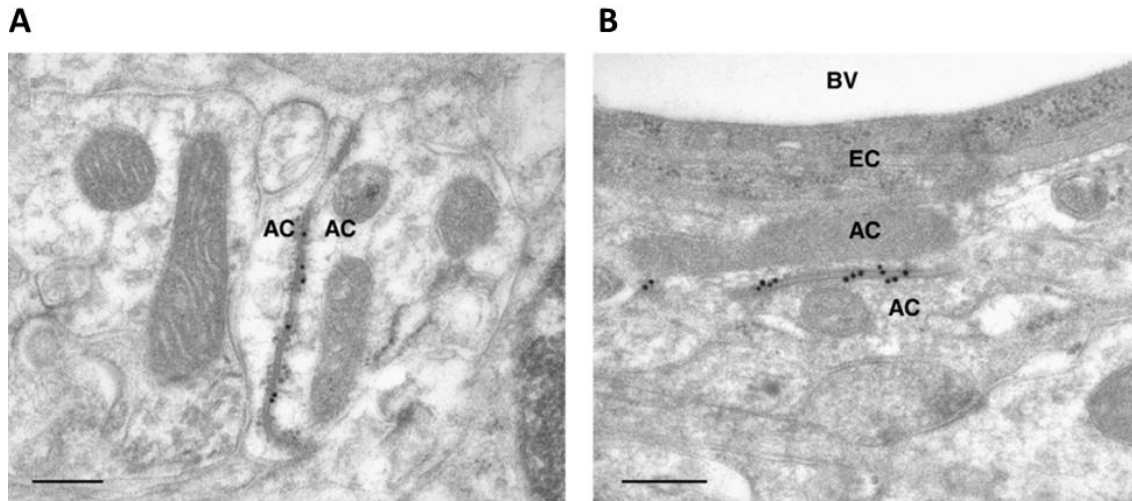


Figura 4. Immuno-detecció per microscòpia electrònica de la proteïna MLC1 en el romboencèfal. Localització de MLC1 a les unions entre astròcits (AC) al protoplasma (**A**) i a la zona perivascular (**B**). Escala 0,25 µm. AC: astròcit, BV: blood vessel, EC: endothelial cell. Imatges extretes de (Teijido et al., 2007).

En cultius primaris d'astròcits, la proteïna endògena MLC1 es detecta de manera difusa al citoplasma, colocalitzant amb marcadors endosomals i del reticle endoplasmàtic (Ambrosini et al., 2008). Estudis posteriors amb cultius primaris d'astròcits de rata tractats amb compostos que bloquegen la proliferació cel·lular i estimulen la diferenciació cel·lular, com *cytosine β-D-arabino-furanoside* (AraC), mostren l'expressió i la localització de MLC1 a les unions entre astròcits (Duarri et al., 2011) (**figura 5**). Aquest model astrocitari permet tenir un model *in vitro* que reproduïx la localització de MLC1 *in vivo*.

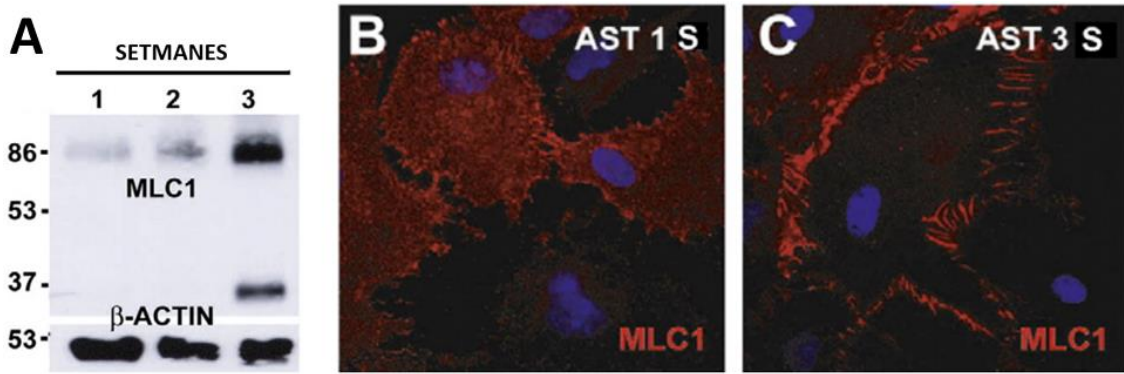


Figura 5. Model astrocitari de MLC. **A)** Expressió de la proteïna MLC1 analitzada per Western blot provinent d'extracte de cultius primaris d'astròcits de rata tractats amb AraC durant 1,2 i 3 setmanes. **B)** Immunocitoquímica de MLC1 (vermell) en cultius primaris d'astròcits. Després d'una setmana de cultiu tractats amb AraC, MLC1 estava difusa pel citoplasma i també es localitzava als contactes entre astròcits (**B**). Després de 3 setmanes tractats amb AraC, MLC1 es localitzava a les unions astròcit-astròcit (**C**). Figura extreta de (Duarri et al., 2011).

Per altra banda, aquest model mostrava una colocalització de MLC1 amb proteïnes de les unions estretes (*tight junctios*) ZO-1 i occludin; proteïnes de les unions adherents β -cadherines i N-cadherines i, una colocalització parcial amb la connexina 43 (Duarri et al., 2011).

Diversos estudis suggereixen una relació entre MLC1 i les proteïnes *distrophin-glycoprotein complex* (DGC) als peus astrocitaris en contacte amb els vasos sanguinis (Ambrosini et al., 2008). Estudis de doble *immunogold* entre MLC1 i β -dístroglicà mostrava que ambdues proteïnes no colocalitzaven (Duarri et al., 2011). A més, en ratolins *knockout* de MLC1 no s'observa alterada la localització de la proteïna sintrofina i les α - i β -dístroglicans (Dubey et al., 2015) i l'expressió de MLC1 no està alterada en ratolins *knockout* de distrofina (Duarri et al., 2011). Per tant, es pot concloure que MLC1 no forma part del complex DGC, però no es descarta que MLC1 interaccioni amb proteïnes del complex DGC durant el tràfic cap a la membrana astrocitària, ja que s'observa colocalització a nivell intracel·lular.

1.2.3.1 Estructura de la proteïna MLC1.

Actualment es desconeix l'estructura de la proteïna MLC1 així com la seva funció. D'aquesta manera, un dels objectius d'aquesta Tesi és resoldre l'estructura de la proteïna MLC1 amb l'objectiu d'entendre la seva funció fisiològica.

Anàlisis de la seqüència d'aminoàcids de MLC1 suggereixen que probablement el gen *MLC1* prové d'una duplicació d'un gen que codificava pels 4 primers dominis TM. Els TMs 4 i 8 contenen un motiu de varies leucines i el *loop* intracel·lular que uneix els TMs 4 i 5 no es troba conservat en els diferents ortòlegs. Per altra banda, coexpressant les parts N- i C-terminal de MLC1 (tallades pel *loop* intracel·lular no conservat que uneix els TMs 4 i 5) s'observa que totes dues parts són capaces d'arribar a la membrana plasmàtica (Estévez et al., 2018). Aquest resultat indica una possible interacció entre les dues parts probablement a través dels motius de leucines.

Estudis bioquímics de coimmunoprecipitació marcant diferents subunitats de MLC1, assajos de tràfic i tècniques d'interacció Split-TEV demostren la homooligomerització de la proteïna MLC1 (**figura 6A**). A més, la detecció de la proteïna MLC1 a través de la tècnica de WB reconeix dues bandes aproximadament a 36 kDa i 72 kDa les quals probablement corresponen a l'estat monomèric i dimèric de la proteïna (**figura 6B**). L'estat monomèric de MLC1 es troba en les fraccions citosòliques mentre que l'estat dimèric està associat a compartiments amb membrana com la membrana plasmàtica o les membranes del reticle (Ambrosini et al., 2008; Lanciotti et al., 2010).

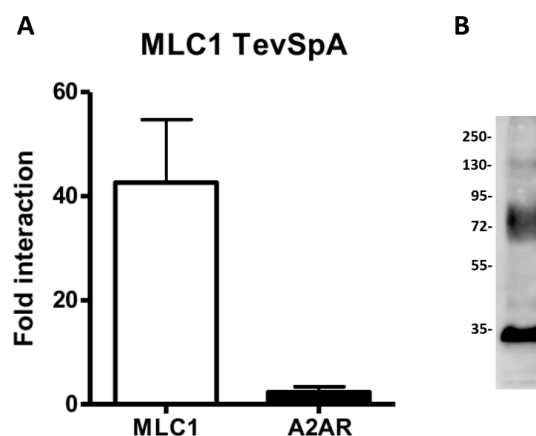


Figura 6. Característiques bioquímiques de la proteïna MLC1. A) Interacció entre dues molècules de MLC1 a través de la tècnica Split-TEV. El receptor A2A va ser utilitzat com a control negatiu. Figura extreta de (Estévez et al., 2018). B) Western blot detectant la proteïna MLC1 utilitzant l'anticòs N4 humà.

Anàlisis de la seqüència primària de MLC1 mostren diversos possibles llocs de modificació post-traduccionals, incloent llocs de fosforilació i glicosilació. Resultats obtinguts del tractament amb endoglicosilasa i mutagènesis dirigida cap el motiu de glicosilació (NPS) localitzat en el segon *loop* extracel·lular descarten la hipòtesis de que MLC1 està glicosilada quan s'expressa en un sistema heteròleg cel·lular (Teijido et al., 2004).

Estudis *in vitro* mostren que els extrems N i C-terminal estan fosforilats per la kinasa PKA/C en la serina 27 i per la kinasa PKC en la serina 339 (Lanciotti et al., 2010). El tractament amb activadors de les kinases PKA o PKC i inhibidors de fosfatases modifiquen l'expressió a la membrana de MLC1 i la formació d'estructures multimèriques (Lanciotti et al., 2010). L'extrem N-terminal presenta un possible domini de retenció del reticle endoplasmàtic (RXR) (Michelsen et al., 2005; Schutze et al., 1994), el qual està pròxim als llocs de fosforilació de PKA i PKC. Aquest fet suggereix una possible via de regulació de la localització a la membrana de MLC1. Per altra banda, MLC1 presenta un motiu d'unió a *coat protein II* (COPII) en l'extrem C-terminal que suggereix una possible regulació indirecta de les quinases de l'exportació de MLC1 a la membrana plasmàtica, similar al que s'observa en alguns canals iònics i transportadors (Zhang et al., 2011). Per altra banda, la seqüència de MLC1 presenta un motiu d'unió a caveolina. Estudis en astròcits de cervell de ratolí i de rata detecten l'expressió de MLC1 en bales de membrana de caveolina (*caveolar membrane rafts*), i s'ha observat la copurificació de MLC1 amb caveolina (Lanciotti et al., 2010). Per últim, indicar que la base de dades PROSITE indica que MLC1 presenta un motiu de la subunitat S14 del ribosoma localitzat en el TM 2 i al principi del primer *loop* intracel·lular (Estévez et al., 2018), però altres estudis suggereixen que és un fals positiu (Peter A.J. Leegwater et al., 2001) (**figura 7**).

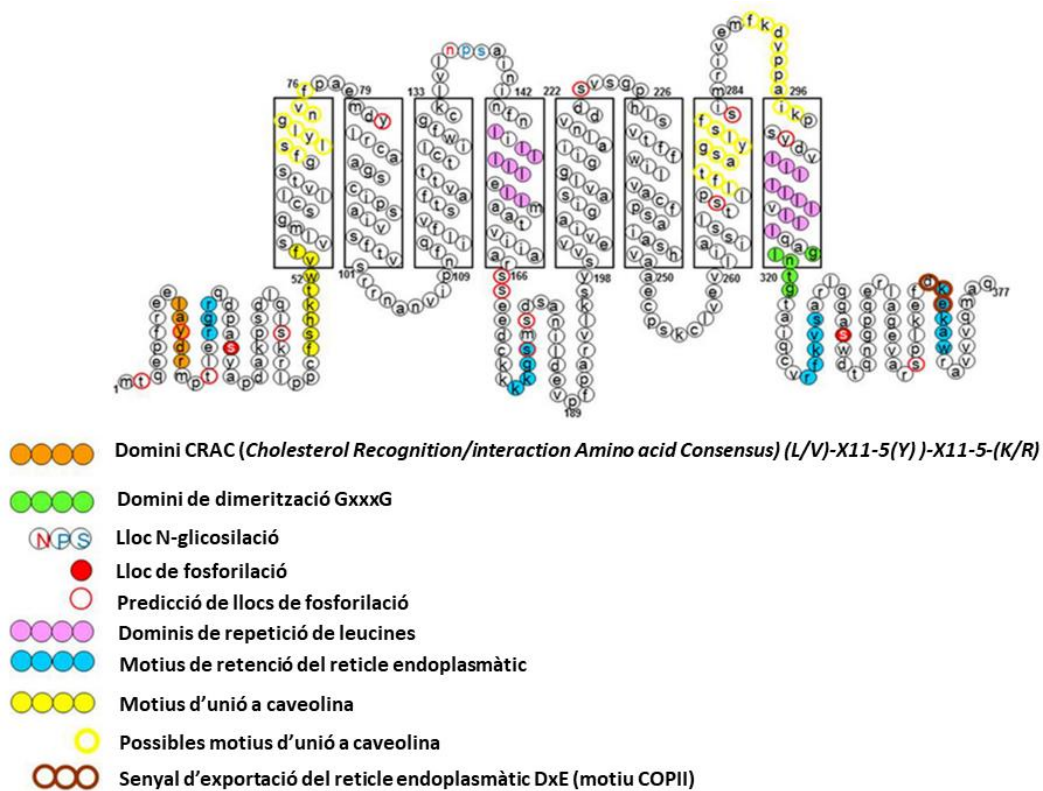


Figura 7. Representació esquemàtica dels motius d'aminoàcids consens identificats en la seqüència primària de la proteïna MLC1. Els possibles motius estan representats amb cercle buits i els motius identificats amb cercles plens. Adaptació de (Brignone et al., 2015).

Anàlisi de la seqüència de MLC1 utilitzant el programa BLAST no mostren cap similitud estructural amb cap proteïna coneguda. Només es detecta una baixa homologia (inferior del 20%) amb la subunitat α del canal de potassi dependent de voltatge Kv 1.1 (Teijido et al., 2004).

1.2.3.2 Mutacions de la proteïna MLC1.

Les mutacions que afecten a la proteïna MLC1 es troben distribuïdes al llarg de tot el gen (Peter A.J. Leegwater et al., 2001). Diversos grups han estudiat les diferents mutacions de MLC1 en sistemes heteròlegs.

La majoria de les mutacions puntuals provoquen una disminució dels nivells d'expressió de la proteïna MLC1 i una menor arribada a la membrana plasmàtica (Lanciotti et al.,

2010; Montagna et al., 2006; Teijido et al., 2004). Generalment, les mutacions causen una retenció de MLC1 en el reticle endoplasmàtic on són dirigides cap el proteosoma on es degrada. Tot i així, hi ha mutacions que són capaces d'arribar a la membrana plasmàtica, tot i que finalment són degradades en els lisosomes (Duarri et al., 2008).

1.3 LA PROTEÏNA GLIALCAM.

La proteïna GlialCAM (de l'anglès *Glial Cell Adhesion Molecule*) és una proteïna de membrana codificada pel gen *GLIALCAM* (Moh et al., 2005). Està formada per 416 aminoàcids i té un pes molecular de 72 kDa.

GlialCAM es troba localitzada majoritàriament a les cèl·lules glials del SNC, i amb uns nivells més baixos en el fetge. Dins del SNC, GlialCAM s'expressa en la substància blanca, majoritàriament en els peus astrocitaris que envolten els vasos sanguinis, en les cèl·lules endodimials que envolten els ventricles i en el canal central de la medulla espinal. A més, s'ha observat expressió de GlialCAM als axons, concretament sobre les capes externes de la mielina i els oligodendròcits (Favre-Kontula et al., 2008; López-Hernández, Ridder, et al., 2011). Estudis d'immunocitoquímica en cultius primaris d'astròcits de rata i imatges de doble *immunogold* de mostres de cervell humà mostren una colocalització de MLC1 i GlialCAM a les unions astrocitaries (López-Hernández, Ridder, et al., 2011) **(figura 8)**.

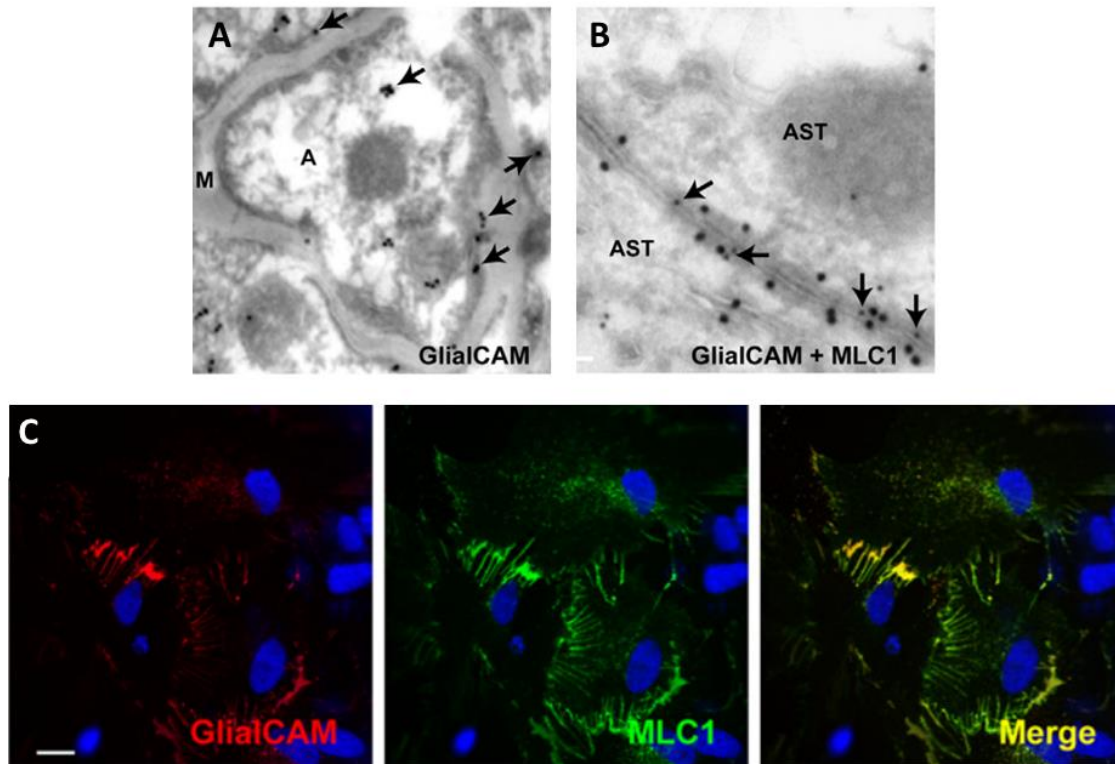


Figura 8. Colocalització de GlialCAM i MLC1 a les unions astrocitàries. **A)** Imatges d'immunogold del cervell humà senyalant GlialCAM en els axons en les regions amb contacte entre la mielina i els axons i les cèl·lules que envolten la mielina. **B)** Doble immunogold que mostra la colocalització de GlialCAM i MLC1 en les unions astròcit-astròcit en teixit humà. Les abreviacions utilitzades són: A: axó, M: mielina i AST: astròcit. **C)** Cultius primaris d'astròcits coïnfectats amb adenovirus que expressaven GlialCAM (vermell) i MLC1 (verd). Totes dues proteïnes colocalitzen a les unions astrocitàries (groc). Figura extreta de (López-Hernández, Ridder, et al., 2011).

1.3.1 Estructura i funció de la proteïna GlialCAM.

Actualment, es desconeix l'estructura i la funció de la proteïna GlialCAM. Anàlisis bioinformàtics de la seqüència primària de GlialCAM han permès determinar que és una proteïna TM tipus I. Per tant, està formada per una gran regió extracel·lular, un únic domini TM i una cua citoplasmàtica.

Per altra banda, GlialCAM és una molècula d'adhesió que forma part de la superfamília de les immunoglobulines, ja que la regió extracel·lular conté un pèptid senyal i dos dominis *immunoglobulin-like* (*Ig-like*) extracel·lulars, un domini IgV pròxim a l'extrem N-terminal i un domini IgC2 pròxim al domini TM. L'extrem C-terminal citoplasmàtic presenta un possible domini d'unió PDZ tipus III, un domini ric amb prolines que poden presentar lloc d'unió a dominis SH3 i possibles llocs de fosforilació (**figura 9**). Els llocs

d'unió a dominis SH3 i els llocs de fosforilació que presenta l'extrem C-terminal podrien tenir un paper important en cascades de senyalització que controlen l'adhesió, la migració, la morfologia cel·lular i altres processos relacionats amb el citoesquelet (Moh et al., 2005).

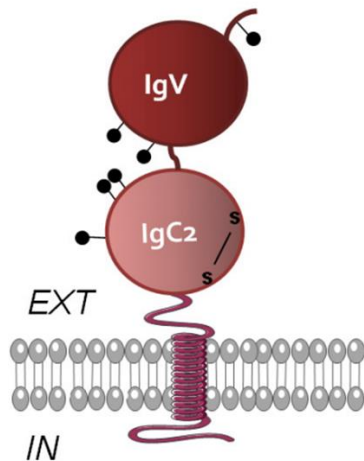


Figura 9. Representació de la proteïna GlialCAM segons prediccions bioinformàtiques. GlialCAM consta d'una gran regió extracel·lular que presenta 2 dominis *Ig-like*, IgV i IgC2 amb un pont disulfur entre dues cisteïnes (S-S); una regió transmembrana i una cua citoplasmàtica. L'extrem N-terminal és extracel·lular i l'extrem C-terminal intracel·lular. Presenta 6 llocs de N-glicosilació en la regió extracel·lular representats amb cercles negres.

GlialCAM és una molècula d'adhesió que té la capacitat de formar interaccions homofíliques, majoritàriament mitjançant interaccions cis (entre molècules de la mateixa cèl·lula), però també mitjançant interaccions trans (entre molècules de diferents cèl·lules) (Capdevila-Nortes et al., 2015; Elorza-Vidal et al., 2020; López-Hernández, Sirisi, et al., 2011; Moh et al., 2005).

Inicialment, GlialCAM va ser identificada com un gen supressor tumoral. La sobreexpressió del gen GLIALCAM està associada a la inhibició del creixement i la proliferació de cèl·lules tumorals (Xun et al., 2010; Zhang et al., 2011). En glioblastoma humà, GlialCAM induïx a la diferenciació cel·lular, accelera l'adhesió cel·lular i inhibeix la migració i la proliferació cel·lular. En canvi, la baixa expressió de GlialCAM contribueix a l'accelerada proliferació de la metastasi (Lay et al., 2009; Xun et al., 2010).

En les cèl·lules gials es desconeix la funció exacte de GlialCAM. Estudis en cultius primaris d'astròcits i en ratolins *knockout* per MLC1 permeten concloure que GlialCAM és una subunitat β essencial de MLC1, permetent l'arribada de MLC1 a la membrana plasmàtica i la seva concentració a les unions cel·lulars (**figura 10**) (Capdevila-Nortes et al., 2013). És a dir, GlialCAM actua com una xaperona de MLC1 permetent el correcte plegament i expressió de MLC1 a les unions cel·lulars. Tot i així, l'expressió i la

localització de GlialCAM són independents de MLC1 (López-Hernández, Sirisi, et al., 2011).

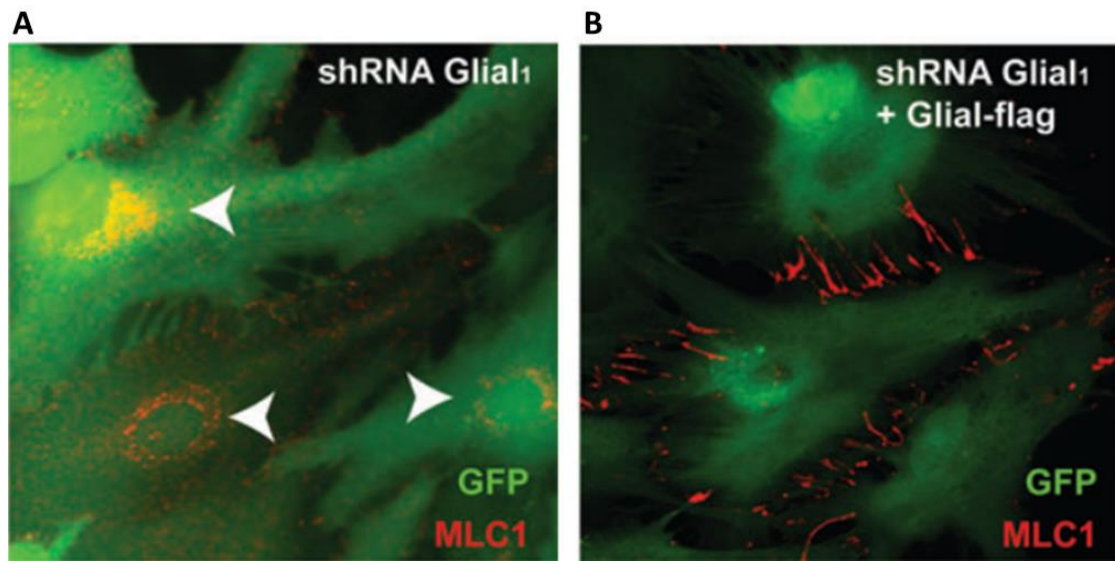


Figura 10. Detecció de MLC1 endògena (vermell) en astròcits on s'ha reprimit l'expressió de GlialCAM mitjançant shRNA (de l'anglès small hairpin RNA). **A)** MLC1 (vermell) es concentra majoritàriament al voltant del nucli (senyalat amb fletxes blanques). **B)** Astròcits cotransfectats amb shRNA i GlialCAM etiquetat amb el tag 3flag (resistent a shRNA). MLC1 (vermell) es concentra a les unions cel·lulars. GFP (verd) utilitzat per visualitzar les cèl·lules transfectades. Figura de (Capdevila-Nortes et al., 2013).

El fet de que GlialCAM, però no MLC1, s'expressi als oligodendròcits indicaria que podria estar interaccionant amb altres proteïnes, suggerint que GlialCAM pot presentar altres funcions per si sola o associada amb altres proteïnes. Estudis inicials de proteòmica van identificar CIC-2 dins de l'interactoma de GlialCAM. Aquests resultats van ser confirmats mitjançant estudis de coimmunoprecipitació i split-TEV els quals mostraven una interacció directa entre totes dues proteïnes (Jeworutzki et al., 2012).

Estudis en sistemes d'expressió heteròloga i en cultius primaris d'astròcits permeten definir que GlialCAM actua com una subunitat auxiliar del canal de clorur CIC-2, permetent l'arribada a les unions astrocitaries i modificant les seves propietats funcionals. GlialCAM incrementa els corrents de CIC-2 canviant les propietats d'activació i l'índex de rectificació del canal, fet que permet que estigui obert en voltatges positius, possiblement a través de modificacions en el *common gating* (Jeworutzki et al., 2012) (**figura 11**). En ratolins *knokout* per *CLCN2* s'observa un fenotip vacuolitzat similar al que

presenten els pacients afectats per MLC (Blanz et al., 2007). S'han identificat mutacions en el gen *CLCN2* d'herència autosòmica recessiva relacionades amb una pèrdua de funció del canal CIC-2 que causen una leucoencefalopatia degut a una microvacuolització de la mielina. Aquests resultats recolzen la idea que el canal CIC-2 en el cervell està implicat en l'homeòstasi iònica i el moviment de l'aigua. Tot i així, no s'han descrit mutacions de *CLCN2* en pacients afectats per MLC.

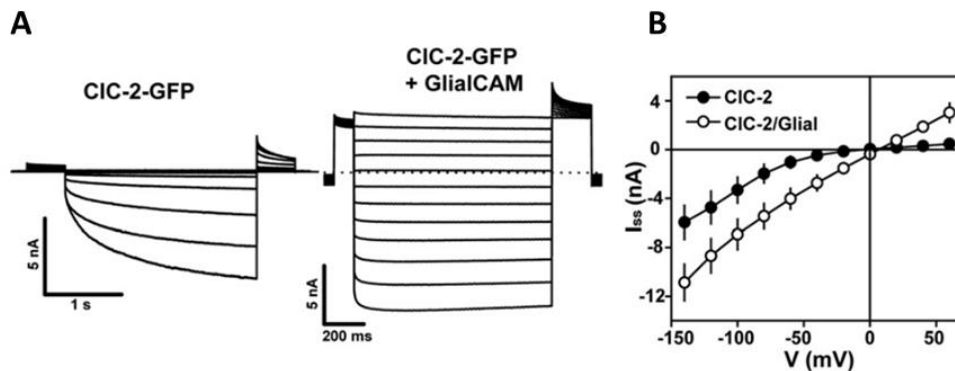


Figura 11. Efecte de GlialCAM al canal CIC-2. A) Corrents de tota la cèl·lula de cèl·lules HEK293 transfectades amb CIC-2-GFP sol (esquerra) o amb GlialCAM (dreta). El tag GFP no afecta a les corrents de CIC-2. B) Mitjana dels corrents de voltatge de cèl·lules HEK293 transfectades amb CIC-2-GFP (cercles negres) o CIC-2-GFP/GlialCAM (cercles blancs). Figures extretes de (Jeworutzki et al., 2012).

1.3.2 Mutacions de la proteïna GlialCAM.

Totes les mutacions de GlialCAM causants de MLC es troben localitzades al domini extracel·lular de la proteïna. Curiosament, les mutacions que afecten al gen *GLIALCAM* poden ser mutacions d'herència recessiva, causant el fenotip clàssic de la malaltia (MLC2A) o bé, mutacions d'herència dominant causant el fenotip benigne (MLC2B).

Mitjançant un model molecular de GlialCAM, observem que les mutacions recessives es troben repartides per tot el domini extracel·lular. En canvi, les mutacions dominants estarien concentrades al domini IgV (**figura 12**).

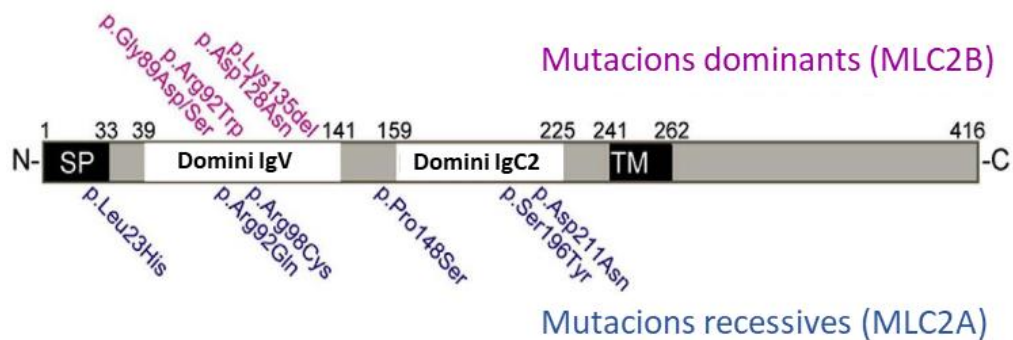


Figura 12. Representació dels dominis de la proteïna GlialCAM i la posició de les mutacions puntuals. Les abreviacions utilitzades: SP, signal peptide; TM, domini transmembrana; Ig, immunoglobulina. Les mutacions puntuals identificades en pacients amb MLC estan representades a dalt (dominants, amb lila) i a baix (recessives, amb blau). SP: pèptid senyal i TM: domini transmembrana. Adaptació de (López-Hernández, Ridder, et al., 2011).

Estudis en cultius primaris d'astròcits mostren que les mutacions de GlialCAM no afecten als seus nivells d'expressió, exceptuant la mutació recessiva L23H que efecte el pèptid senyal provocant l'abolició de l'expressió de GlialCAM i, la mutació W263X que trunca GlialCAM provocant la reducció dels seus nivells d'expressió. Principalment, les mutacions causen una disminució en la capacitat d'homooligomerització de GlialCAM, fet que provoca un defecte a l'arribada a les unions cel·lulars (Arnedo et al., 2014; López-Hernández, Ridder, et al., 2011; López-Hernández, Sirisi, et al., 2011).

La majoria de les mutacions de GlialCAM, localitzades en el domini IgV, redueixen la capacitat de cis-homooligomeritzar, provocant un defecte de l'arribada de GlialCAM a les unions cel·lulars, i perdent la capacitat de portar a MLC1 i CIC-2 a les unions cel·lulars, encara que la interacció entre GlialCAM i MLC1 no estigui afectada (Arnedo et al., 2014; López-Hernández, Sirisi, et al., 2011). Com a excepció trobem les mutacions dominants D128N (MLC2B) que no presenta cap problema de cis-homooligomerització, però no es capaç d'arribar a les unions cel·lulars i la mutació K135Del que no s'ha trobat cap defecte (Arnedo et al., 2014). Les mutacions recessives que no presenten cap d'aquets defectes són: R73W, P148S, S196Y i D211N (Arnedo et al., 2014; López-Hernández, Sirisi, et al., 2011).

Cap de les mutacions de GlialCAM identificades en pacients (MLC2A o MLC2B) mostren una disminució en la interacció de GlialCAM amb MLC1 o CIC-2. A més, tots els mutants conserven la capacitat de canviar les propietats funcionals del canal CIC-2, encara que

no arribi a les unions cel·lulars (Arnedo et al., 2014; Jeworutzki et al., 2012). En canvi, les mutacions localitzades en el domini IgC2 no afecten l'arribada de GlialCAM a les unions cel·lulars.

La coexpressió de GlialCAM nativa (WT; *wild type*) amb GlialCAM amb mutacions dominants efecte l'arribada de GlialCAM WT a les unions cel·lulars. Fet que no succeeix quan es coexpressa GlialCAM WT amb GlialCAM amb mutacions recessives. Aquests experiments s'han pogut validar *in vivo* mitjançant el model de ratolí *knockin* GlialCAM que conté la mutació dominant G89S identificada en pacients (MLC2B) (Hoegg-Beiler et al., 2014). En aquest model s'ha pogut validar com la mutació G89S efecte a l'arribada de GlialCAM a les unions cel·lulars (**figura 13**).

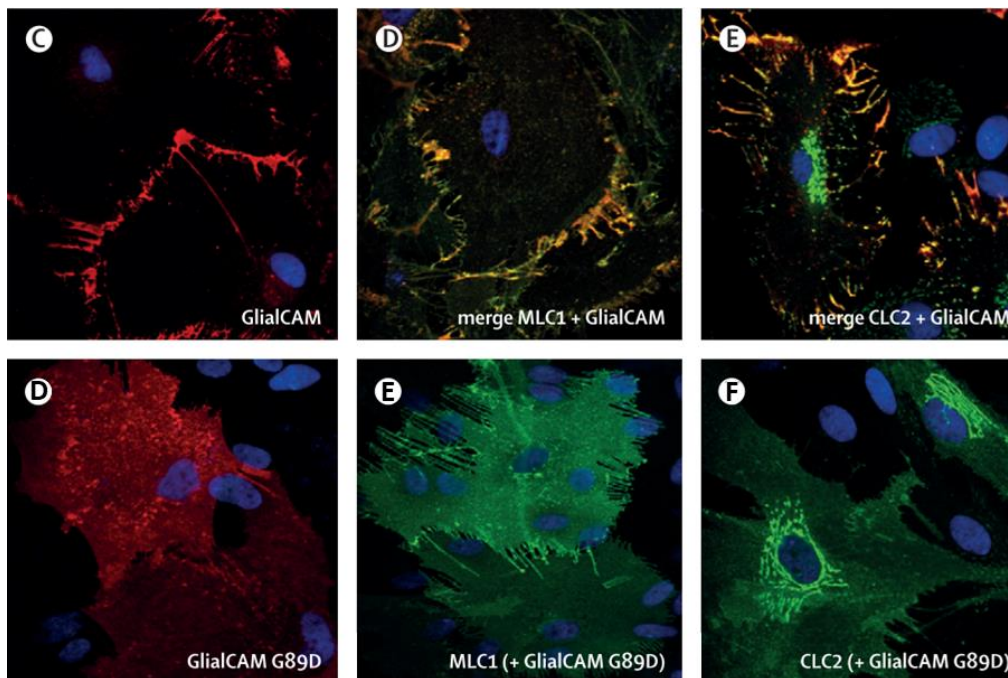


Figura 13. Immunocitoquímica de cultius primaris d'astròcits analitzant la localització de GlialCAM, MLC1 i CLC-2. Localització a les unions astrocitaries de GlialCAM (A), MLC1 coexpressada amb GlialCAM (B) i CLC-2 coexpressat amb GlialCAM (C). En canvi, la presència d'una mutació de GlialCAM causant MLC (G89D) efecte a la localització de GlialCAM (D), MLC1 (E) i CLC-2 (F). Figura extreta de (van der Knaap et al., 2012).

En cultius primaris d'astròcits *knockout* per MLC1 en condicions despolaritzants s'observa que la proteïna GlialCAM està deslocalitzada (Sirisi et al., 2014). En canvi, en aquestes condicions, la mutació dominant K135del i les mutacions recessives S196Y i D211N es troben localitzades a les unions cel·lulars. Per altra banda, la mutació recessiva

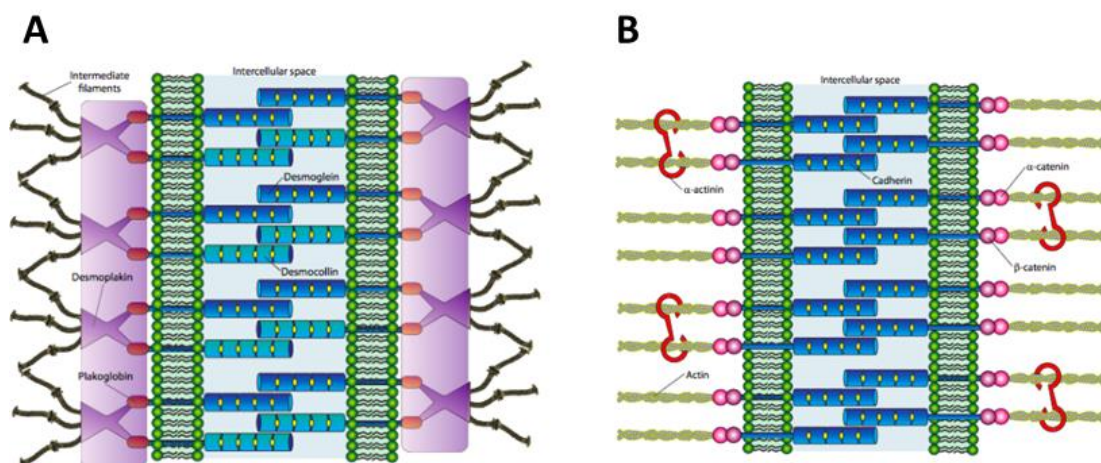
P148S es troba deslocalitzada tan en condicions fisiològiques com despolaritzants (Arnedo et al., 2014).

Les mutacions recessives de GlialCAM R92Q i R98C coexpressades amb MLC1 provoquen una deslocalització de totes dues proteïnes. Provocant l'acumulació de MLC1 a nivell intracel·lular i la localització parcial de GlialCAM a la membrana plasmàtica, però no a les unions cel·lulars. El mateix efecte es veu en les mutacions dominants de GlialCAM R92W i G89D. Actualment, no hi ha suficient coneixement que expliqui perquè una mutació de GlialCAM és recessiva o dominant.

2. POSSIBLE FUNCIÓ BIOLÒGICA DE LA PROTEÏNA GLIALCAM EN L'ADHESIÓ CEL·LULAR.

L'adhesió cel·lular és el procés pel qual les cèl·lules estableixen contactes entre si i amb la matriu extracel·lular (ME), permetent la correcta formació i el manteniment de teixits i òrgans en els organismes multicel·lulars (Cavallaro & Dejana, 2011; Ogita et al., 2010). Les unions entre cèl·lules es poden classificar en tres categories: unions simètriques, quan l'unió es dona entre cèl·lules del mateix tipus; unions asimètriques, observades normalment en les sinapsis formades per l'axó d'una neurona i la dendrita d'una altra neurona; i les unions heterotípiques, quan l'unió es dona entre diferents tipus cel·lulars (Ogita et al., 2010).

Les unions cel·lulars estan formades per diferents complexos d'unió altament especialitzats incloent les unions adherents, les unions estretes (en anglès *tight junctions*), els desmosomes i les unions comunicants (en anglès *gap junctions*) (**figura 14**). Les unions adherents mantenen la integritat estructural dels teixits, permetent l'unió entre dues cèl·lules veïnes. Les unions estretes tenen dues funcions principals: actuar com una barrera evitant que les molècules solubles passin entre les cèl·lules; i actuar com una tanca en la superfície cel·lular, separant els lípids i les proteïnes de la regió basolateral dels de la regió apical. Els desmosomes connecten cèl·lules veïnes i són necessaris per l'estabilitat de les unions adherents. Finalment, les unions comunicants formen canals entre dues cèl·lules, a través dels quals hi ha una transmissió directa de molècules (Ogita et al., 2010).



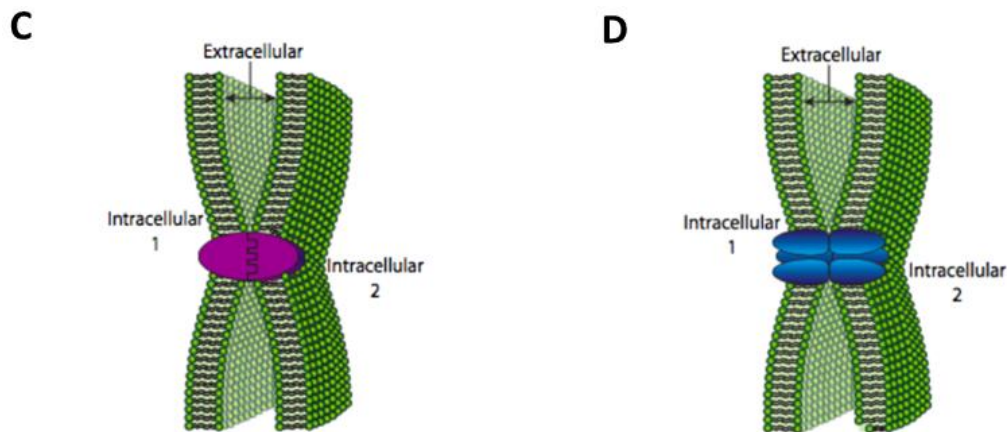


Figura 14. Representació de les diferents unions cel·lulars. A) Desmosoma. B) Unions adherents. C) Unions estretes D) Unions comunicants. Figura adaptada de (Wong & Open Textbook Library, 2009).

Les proteïnes responsables de formar l'adhesió cel·lular s'anomenen molècules d'adhesió cel·lular o CAMs, de l'anglès *Cell Adhesion Molecules*. Les CAMs són una família de proteïnes localitzades a la superfície cel·lular que estan involucrades en diversos processos biològics com la diferenciació cel·lular, la inhibició del creixement cel·lular per contacte, la mort cel·lular per apoptosi, la migració cel·lular, la morfogènesis, la regulació de l'expressió gènica, la divisió cel·lular i la senyalització. Estructuralment, són proteïnes integrals de membrana compostes per un domini extracel·lular, un domini TM i un domini citoplasmàtic. El domini extracel·lular permet l'unió amb els lligands d'altres cèl·lules o la matriu extracel·lular (ME), a través d'interaccions homofíliques (entre molècules d'adhesió del mateix tipus) o heterofíliques (entre molècules d'adhesió de diferent tipus); i el domini citoplasmàtic permet la interacció amb les proteïnes del citoesquelet, obtenint un ancoratge intracel·lular (Cavallaro & Dejana, 2011; Ogita et al., 2010).

2.1 CLASSIFICACIÓ DE LES CAM.

Les CAMs són glicoproteïnes TM tipus I. És a dir, que estan formades per: un domini extracel·lular que correspon a l'extrem N-terminal, un domini de membrana i un domini citoplasmàtic que correspon a l'extrem C-terminal. Segons la seva estructura, les CAMs

es classifiquen en quatre grans famílies: les cadherines, les integrines, les selectines i la superfamília de les immunoglobulines (IgSF).

Les **cadherines** són molècules d'adhesió que estructuralment es caracteritzen per presentar motius de repetició de cadherina en el domini extracel·lular (*extracellular cadherin repeat domains*, ECRD). Aquestes repeticions presenten uns motius d'unió a ions calci altament conservats, provocant que les interaccions que formen entre cèl·lules siguin dependents del calci. L'extrem C-terminal interacciona amb una gran varietat de molècules que uneix les cadherines al citoesquelet. Funcionalment, tenen un paper important en l'organització i la morfogènesis de teixits, estan involucrades en el reconeixement i l'organització cel·lular i coordinen el moviment cel·lular. La superfamília de les cadherines està composta per més de 100 membres en vertebrats i es divideixen en dos subfamílies: les cadherines clàssiques i les protocadherines.

- Les **cadherines clàssiques** es caracteritzen per presentar 5 ECRD a la regió extracel·lular i interaccionar amb la proteïna citoplasmàtica catenin a través de la regió citoplasmàtica, connectant les cadherines amb l'actina del citoesquelet (Bertocchi et al., 2017). Per altra banda, la regió extracel·lular forma interaccions homofíliques amb les cadherines de cèl·lules adjacents formant unions adherents. La formació de les unions adherents és essencial per la morfogènesis i la integritat del teixits. A més, són essencials per l'homeòstasi en diferents teixits (Cao, 2019). Els complexos cadherin-catenin es troben localitzades a varies poblacions neuronals del sistema nerviós central on estan involucrades en la formació i la organització de sinapsis.
- Les **protocadherines** presenten un nombre variat de dominis ECRD, però a diferència de les cadherines clàssiques, el domini citoplasmàtic no interacciona amb les catenines. Es troben localitzades a les sinapsis, però degut a les múltiples isoformes de α - i β -protocadherines identificades, i l'elevada diversitat que presenten es suggereix que estan involucrades en diferents papers en la sinapsis (Togashi et al., 2009).

Les **integrines** són la principal família de molècules d'adhesió que uneix la cèl·lula amb la ME, permetent traspasar la senyal de la ME a la cèl·lula (Togashi et al., 2009).

Estructuralment, les integrines són glicoproteïnes heterodimèriques formades per subunitats α i β . Cada subunitat està formada per un domini TM, una regió extracel·lular gran on s'uneix el lligand, i una petita regió citoplasmàtica. En vertebrats s'han identificat 8 subunitats β i 18 subunitats α que combinen formant 24 heterodímers diferents. Cada heterodímer s'uneix específicament al seu lligand, encara que en alguns casos el lligand pot ser el mateix per varis heterodímers (Arnaout et al., 2005; Barczyk et al., 2010).

Les integrines presenten diferents estats de conformació que estan relacionats amb l'afinitat als seus lligands. Quan presenten una conformació corbada, les integrines tenen una baixa afinitat amb els seus lligands i no estan unides ni al citoesquelet ni a proteïnes importants d'ancoratge cel·lular (conformació inactiva). En canvi, quan presenten una conformació desplegada, les integrines tenen una alta afinitat amb els seus lligands i està unida amb el citoesquelet i a proteïnes d'ancoratge cel·lular (conformació activa) (Cao, 2019). Es suggereix que la conformació inactiva de les integrines podria estar activada a través de senyals cel·lulars "dins-fora", la interacció de la subunitat β amb les proteïnes citosòliques talina i kindlina podria canviar a la conformació activa, augmentant l'afinitat als lligands de la ME. Per altra banda, l'unió amb els lligands de la ME podria reclutar proteïnes d'ancoratge, quinases i fosfatases que regularien la cèl·lula (**figura 15**).

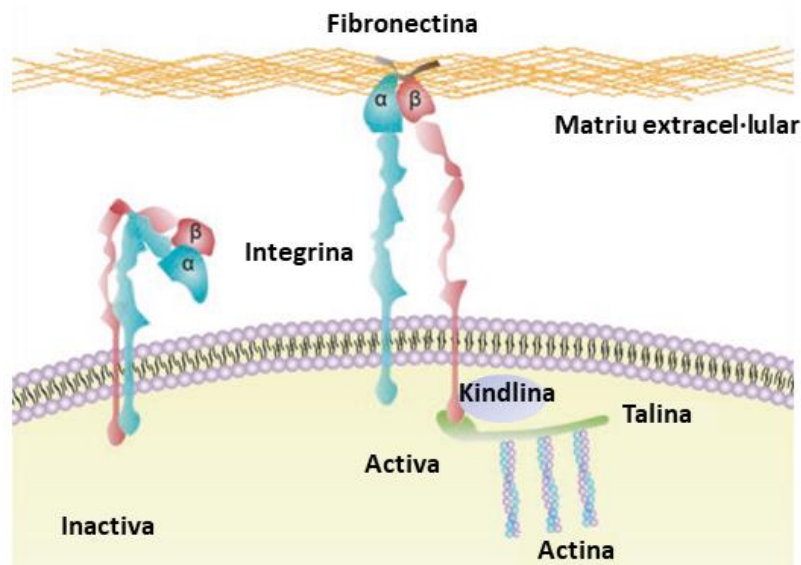


Figura 15. Conformació activa i inactiva de les integrines. Les senyals “dins-fora” que és una interacció intracel·lular entre la integrina β i altres proteïnes com la tal·lina o la kindlina, provoquen que el receptor estigui a una conformació desplegada (activa) la qual presenta una major afinitat pels lligands de la ME. Les integrines inactives no estan unides a proteïnes ancoratge del citoesquelet presentant una conformació corbada la qual presenta menor afinitat per les proteïnes de la ME. Figura extreta de (Cao, 2019).

Una de les funcions importants de les integrines és la migració cel·lular gràcies a l'unió amb la matriu extracel·lular. La transducció de senyals que permeten la senyalització cel·lular, la organització del citoesquelet intracel·lular i el moviment de nous receptors a la membrana plasmàtica (Cao, 2019).

En el sistema nerviós central, les integrines formades per la subunitat $\beta 1$ i αV es troben expressades a diversos tipus cel·lulars com les neurones, les cèl·lules glials, les cèl·lules de les meninges i les cèl·lules endotelials (Einheber et al., 2001). Les integrines amb la subunitat $\beta 2$ s'expressen en la micròglia, i estan involucrades en la resposta immunològica a través dels leucòcits. Per altra banda, regulen la proliferació i la migració dels oligodendròcits. L'unió de les integrines amb la proteïna de la ME trombospondina, facilita la formació sinàptica (Christopherson et al., 2005). En el sistema nerviós perifèric, les integrines són essencials per la formació de les unions neuromusculars i permeten l'unió de les cèl·lules de Schwann a la ME.

Les **selectines** són molècules d'adhesió vasculars dependents de calci. Es divideixen en tres tipus amb un patró d'expressió diferent. Les L-selectines són expressades en leucòcits, les E-selectines són expressades en cèl·lules endotelials i les P-selectines són

expressades en plaquetes i cèl·lules endotelials. Els 3 tipus de selectines presenten una estructura similar composta per un extrem N-terminal que presenta: un domini de lectina, un domini EGF-*like* i varies repeticions *consensus* (2, 6 i 9 per L-, E- i P-selectines, respectivament); un domini TM i un domini citoplasmàtic C-terminal (**figura 16**). Les selectines uneixen a glicoproteïnes que presenten motius *Lewis X*. Estan involucrades en la inflamació, la resposta immunitària i l'homeòstasi (Ley, 2003).

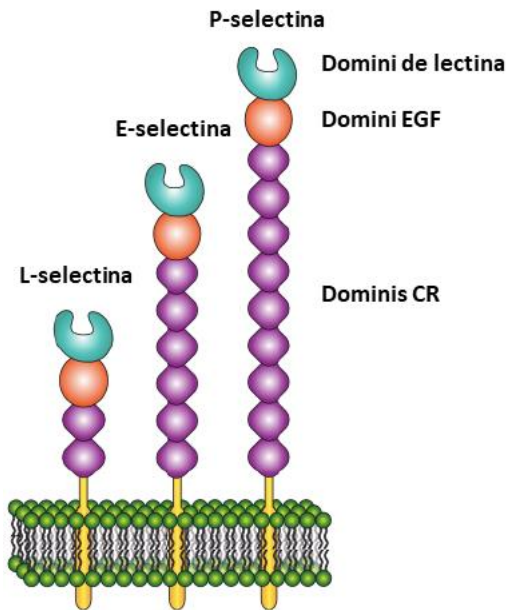


Figura 16. Representació de les selectines. La regió extracel·lular està composta per un domini de lectina, un domini EGF i repeticions CR, depenent de cada selectina. Tot seguit, presenta un domini TM i un domini citoplasmàtic. Figura extreta de (Wong & Open Textbook Library, 2009).

La **superfamília de les immunoglobulines (IgSF)** són molècules d'adhesió que presenten dominis *Ig-like* a la regió extracel·lular. A través del dominis *Ig-like* s'acostuma a produir interaccions homofíliques trans. El domini citoplasmàtic s'uneix a l'actina del citoesquelet responsable de la senyalització. Estudis d'estructura mostren la formació d'estructures en forma de cremallera (en anglès *zipper structures*) a les unions cel·lulars a través d'interaccions trans i interaccions cis (Aricescu & Jones, 2007).

Gràcies a la capacitat d'iniciar cascades de senyalització bidireccional a les unions cel·lulars, les IgCAM estan involucrades en varis processos biològics com la proliferació cel·lular, la diferenciació cel·lular i la morfogènesis (Cao, 2019).

2.2 LES CAMs EN EL SISTEMA NERVIÓS CENTRAL (SNC).

El sistema nerviós està format per una complexa xarxa d'interconnexions cel·lulars. Aquest sistema d'adhesió cel·lular és important per la morfologia del cervell i la coordinació de les seves funcions com la memòria i l'aprenentatge (Shapiro et al., 2007).

Estudis funcionals mostren com les CAMs estan implicades en diferents aspectes del desenvolupament de la xarxa neuronal, incloent la migració neuronal, la formació de sinapsis i la formació de la xarxa de cèl·lules glials que envolten els axons i les sinapsis (Shapiro et al., 2007; Togashi et al., 2009).

Les CAMs permeten la interacció entre neurones, fet essencial pel creixement axonal i la formació i el manteniment de les sinapsis. Permeten la comunicació entre neurones i astròcits, important per la transmissió sinàptica, la conducció axonal i la modulació de la xarxa neuronal (Togashi et al., 2009; Washbourne et al., 2004); i també són importants en la configuració i la integritat de la barrera hematoencefàlica formada per unions estretes a través de la claudina i la ocludina. La barrera hematoencefàlica està altament regulada per controlar l'accés de molècules o components del sistema immunitari al SNC (Breiding, 2014).

Les sinapsis són unions intercel·lulars altament especialitzades entre l'axó d'una neurona i un altre cèl·lula, formant un contacte funcional. Majoritàriament, és una interacció asimètrica on s'identifiquen varies CAMs. En les sinapsis, trobem dos tipus d'estructura d'adhesió, l'anomenada *synaptic junctions* (SJs) i la *puncta adherentia junctions* (PAJs). Les SJs estan associades a la zona presinàptica on hi ha canals de calci i nombroses vesícules sinàptiques que contenen el neurotransmissor unides amb la zona postsinàptica on hi ha els receptors dels neurotransmissors i proteïnes d'ancoratge i senyalització. Les PAJs són llocs d'adhesió entre el final de l'axó i la cèl·lula amb la que forma la sinapsis que no estan associats amb les vesícules sinàptiques. Morfològicament, són similars a les unions adherents, però es desconeix la seva funció exacte (**figura 17**) (Togashi et al., 2009).

Algunes de les CAMs que es localitzen o tenen un paper important en les sinapsis són:

Les **nectines** són molècules d'adhesió independents de calci que pertanyen a la IgSF. Tenen la capacitat d'interaccionar en trans (molècules de diferents cèl·lules) formant

homo- i heterodímers, permetent l'unió entre cèl·lules adjacents. Per altra banda, el domini intracel·lular de les nectines s'uneix amb la proteïna afadina, unint les nectines al citoesquelet d'actina. Les nectines indueixen senyals intracel·lulars, estan involucrades en la reorganització del citoesquelet i són importants per la formació de les unions adherents. Aquestes accions requereixen els complexos cadherines-catenines, fet que suggereix una possible cooperació entre els dos sistemes d'adhesió. Defectes en les nectines causen diverses malalties mentals, possiblement relacionades amb alteracions en les unions adherents de les sinapsis, causant unions defectives entre axons i espines dendrítiques (Ogita et al., 2010; Takai & Nakanishi, 2003; Togashi et al., 2009).

Les **molècules d'adhesió cel·lular neuronal** (en anglès *neural cell adhesion molecule*, **NCAM**) pertanyen a la IgSF. Es caracteritzen per presentar 5 dominis *Ig-like* i 2 repeticions de fibronectina tipus III. Tenen la capacitat de formar interaccions homofíliques i hereofíliques amb una ampla varietat de lligands a les sinapsis. Presenten una elevada expressió en el sistema nerviós central tant en el seu desenvolupament com en el cervell adult on desenvolupen un paper important en la migració cel·lular i la plasticitat sinàptica. A més, estan involucrades en la sinaptogènesi i la maduració sinàptica (Togashi et al., 2009).

La família de les **SynCAM** són molècules d'adhesió de la IgSF composta per quatre membres (SynCAM 1-4) que estan localitzades a les terminals pre- i postsinàptiques durant el desenvolupament cerebral i el cervell adult (Biederer, 2006). SynCAM 1 presenta quatre dominis *Ig-like* i SynCAM 2 presenta set dominis *Ig-like* i una repetició de fibronectina tipus III. La interacció heterofílica entre SynCAM 1 i SynCAM 2 és la principal responsable de la formació de sinapsis en el SNC. SynCAM 1 participa en els primers estadis de la sinaptogènesi i contribueix a la regulació de sinapsis excitatòries en el cervell, alterant el número de sinapsis i la seva plasticitat (Robbins et al., 2010).

Les **neuroligines (NLs)** i les **neuroxines (NRXs)** són molècules d'adhesió que es localitzen a la regió postsinàptica i la regió presinàptica de la sinapsi, respectivament. Estructuralment, les NLs estan compostes per una gran regió extracel·lular homòloga al domini esterasa, a través de la qual forma homodímers, i el domini citoplasmàtic s'uneix a proteïnes intracel·lulars que presenten dominis PDZ. En la sinapsi, totes dues

proteïnes interaccionen entre si en trans formant el complex NL-NRX crucial pel desenvolupament i el manteniment de les sinapsis. Totes dues proteïnes presenten una elevada diversitat. En el cas de les NLs, el genoma humà consta de quatre gens diferents: dos gens autosòmics *NLGN1* i *NLGN2* i, 2 gens lligats al cromosoma X *NLGN3* i *NLGN4* els quals presenten un patró d'expressió diferent. La NL 1 es localitza en sinapsis excitatòries; la NL 2 en sinapsis inhibidores, dopaminèrgiques i colinèrgiques; la NL 3 es localitza tan en sinapsis inhibidores com excitatòries; i la NL 4 en sinapsis glicinèrgiques. A més, cada gen presenta un o dos llocs alternatius d'*splicing*, augmentant la seva diversitat. Per altra banda, les NRXs també presenten una elevada diversitat degut a la presència de tres gens, dos promotors (α i β) i sis llocs alternatius d'*splicing* (Elegheert et al., 2017; Südhof, 2008).

Totes dues proteïnes tenen la capacitat d'interaccionar amb altres molècules d'adhesió o amb altres proteïnes postsinàptiques. Aquest fet, més l'elevada diversitat genètica que presenten, explica les múltiples funcions que duen a terme en els diferents tipus de sinapsis (Südhof, 2008).

Recentment, s'ha identificat una tercera família de molècules d'adhesió que regulen la interacció trans-sinàptica entre les NLs i les NRXs, anomenades MDGA 1 i 2 (de l'anglès *MAM domain-containing glycosylphosphatidylinositol anchor 1 or 2*). Les MDGAs estan compostes per sis dominis *Ig-like*, un domini de fibronectina tipus III i un domini MAM (meprina, proteïna A5 i PTP $_{\mu}$). Estan localitzades a la membrana postsinàptica ancorades a través glicosilfosfatidilinositol (GPI). Les MDGAs interaccionen en cis amb les NLs impeding l'unió amb les NRXs; i modulant d'aquesta manera, la formació de sinapsis que formen el complex NLs-NRXs (Connor et al., 2016; Gangwar et al., 2017).

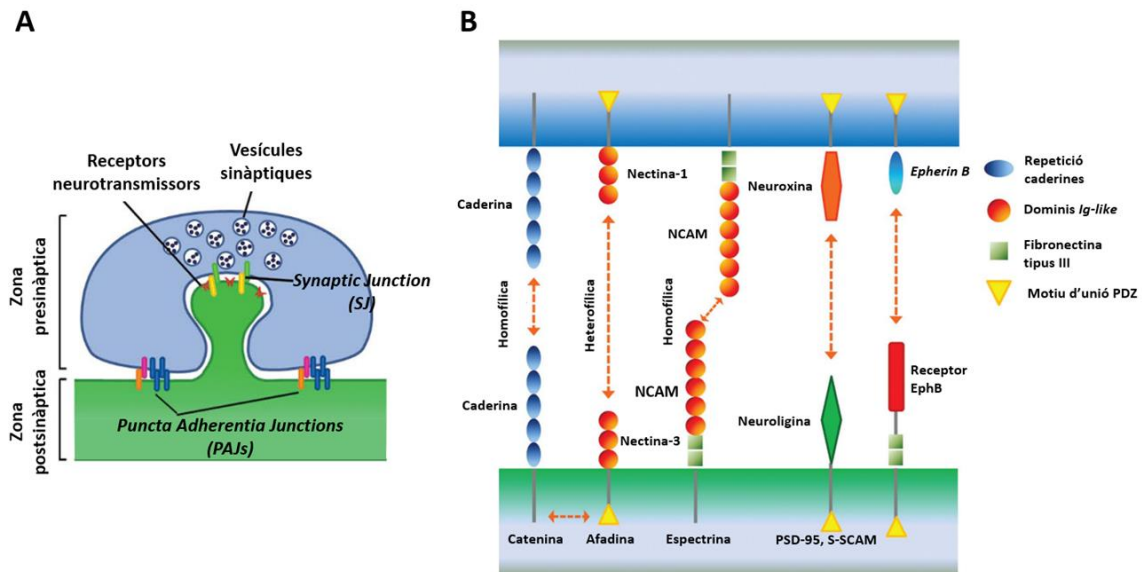


Figura 17. Representació esquemàtica d'una sinapsi mostrant algunes de les CAMs implicades. A) Les sinapsis estan formades per dos tipus d'unions intercel·lulars, la *synaptic junction* (SJ) associada amb vesícules sinàptiques a la zona presinàptica on es localitzen els receptors dels neurotransmissors i, la *puncta adherentia junctions* (PAJs) que no està associada a les vesícules sinàptiques. **B)** Composició molecular d'una sinapsi representant algunes CAMs implicades i els seus dominis extracel·lulars i intracel·lulars. Figura extreta de (Togashi et al., 2009).

S'han identificat moltes altres molècules d'adhesió relacionades amb la formació d'estructures d'adhesió en el SNC. Tot seguit, ens centrarem amb la IgSF, ja que una de les nostres proteïnes d'estudi és GlialCAM la qual pertany a aquesta família.

2.3 LA SUPERMAFÍLIA DE LES IMMUNOGLOBULINES (IgSF).

Les molècules d'adhesió *immunoglobulin-like* (IgCAM) pertanyen a la superfamília de les immunoglobulines (de l'anglès *immunoglobulin* superfamily, IgSF). La IgSF és una superfamília de proteïnes composta per qualsevol proteïna que presenti un domini *Ig-like* (Cameron & McAllister, 2018).

El domini *Ig-like* és una estructura en sandvitx composta per dos làmines β , les quals formen un plegament que està estabilitzat per un pont disulfur intra-dominis. Existeixen 4 subtipus diferents de dominis *Ig-like*: constant 1 (IgC1), constant 2 (IgC2), variable (IgV) i intermedi (Igl) anomenats per la seva semblança al domini Ig. Per altra banda, varies IgCAMs també presenten el domini de repetició de fibronectina tipus III, la qual també és una estructura en sandvitx que intervé en les interaccions entre proteïnes (Cameron & McAllister, 2018; Zinn & Özkan, 2017).

Degut al fet que les proteïnes que presenten un domini *Ig-like* formen part de la IgSF provoca que sigui una de les famílies més grans codificada en el genoma humà. Està composta per una ampla varietat de proteïnes que estan involucrades en diverses funcions com el transport molecular, la regulació morfològica, marcadors cel·lulars, resposta immunitària, regulació genètica, migració cel·lular i l'adhesió cel·lular mitjançant les IgCAM (Zinn & Özkan, 2017). En aquest capítol, ens centrarem en aquestes últimes.

Les IgCAM són glicoproteïnes transmembrana tipus I. És a dir, estan compostes per un gran domini extracel·lular, on es localitzen els dominis d'immunoglobulines; una regió de membrana; i una cua citoplasmàtica. La família IgCAM està composta per una àmplia varietat de proteïnes les quals es localitzen a diferents tipus cel·lulars i teixits. A més, les IgCAM participen en una complexa xarxa d'interaccions on acostumen a unir-se a múltiples proteïnes. Aquests fets fan que les IgCAM estiguin involucrades a diferents processos biològics. Una de les funcions més importants que estan involucrades les IgCAMs és en el desenvolupament del sistema nerviós on diferents membres d'aquesta família participen en guiar l'axó, i en l'establiment i el manteniment de les connexions neuronals (Reatments et al., 2003).

Un dels objectius d'aquesta Tesi és ampliar el coneixement sobre l'estructura de la proteïna GlialCAM. Coneixem que GlialCAM és una molècula d'adhesió que pertany a la IgSF, i tot i que actualment es desconeix la seva estructura, mitjançant estudis bioquímics i prediccions bioinformàtiques es coneix que la seva regió extracel·lular presenta dos dominis *Ig-like* (explicat en l'apartat de la introducció 1.3.1). Dintre la IgSF, les IgCAMs compostes per dos dominis *Ig-like* són una petita família composta per 6 proteïnes on la màxima representant és la proteïna CAR (*Coxsackie-Adenovirus Receptor*) i, la proteïna JAM (*Junctional Adhesion Molecules*). Degut a la similitud que presenten amb la proteïna GlialCAM, en els següents apartats ens centrarem en l'estructura de les proteïnes CAR i JAM (**figura 18**).

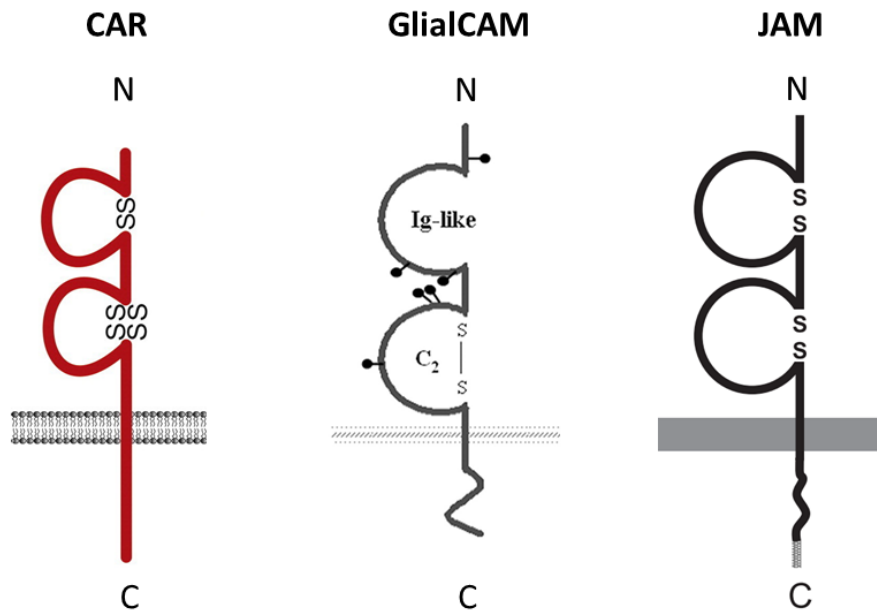


Figura 18. Representació esquemàtica de les molècules CAR, GlialCAM i JAM. Les tres molècules són proteïnes de membrana amb una gran regió extracel·lular on es localitzen els dos dominis *Ig-like*, un domini TM i una cua citoplasmàtica. Figures extretes de (Mandell & Parkos, 2005; Matthäus et al., 2017; Moh et al., 2005).

2.3.1 Característiques estructurals de les molècules CAR (*Coxsackievirus-Adenovirus Receptor*).

La proteïna CAR (de l'anglès *coxsackie-adenovirus receptor*) forma part d'una subfamília de proteïnes anomenada *CAR-related proteins*, composta per: CAR, CLMP, BT-IgSF i ESAM. Totes elles són glicoproteïnes transmembrana tipus I i en general, presenten la mateixa organització, incloent dos dominis extracel·lulars *Ig-like*, una hèlix transmembrana i una cua citoplasmàtica. La diferència entre les diferents proteïnes recaurà en el motiu d'unió PDZ localitzat a l'extrem C-terminal (Berezin & Walmod, 2014; Matthäus et al., 2017).

En aquest apartat, ens centrarem en la proteïna CAR, ja que és la única d'elles que s'ha obtingut l'estructura tridimensional de la regió extracel·lular per cristal·lografia de raigs X (Patzke et al., 2010; Verdino et al., 2010).

Estructuralment, la proteïna CAR està formada per una regió extracel·lular de 218 aminoàcids (aa), una regió transmembrana de 21 aa i una cua citoplasmàtica de 94 (isoforma 1) o 107 (isoforma 2) aa. En la regió extracel·lular es localitzen el dos dominis *Ig-like* separats entre si per 5 aa. El domini IgV (D1) és el més distant de la membrana

plasmàtica, i el domini IgC2 (D2) és el més pròxim. La proteïna CAR presenta dues isoformes degut a un *splicing* diferent del pre-mRNA. Totes dues isoformes són idèntiques, excepte per l'extrem C-terminal que presenta un motiu d'unió PDZ classe I acabat amb els aa SIV o TVV que corresponen a la isoforma 1 i 2, respectivament (Excoffon, K.J.D.A., R. Bowers, J., Sharma, 2014; Matthäus et al., 2017).

La resolució de l'estructura tridimensional de la regió extracel·lular de la proteïna CAR, va permetre identificar la superfície d'interacció entre els dominis IgVs de cada molècula implicada en la formació de homodímers. La superfície d'interacció està localitzada a la part distal del domini D1 i està formada per varis cadenes laterals provinents de les làmines β G, F, C, C', C'' i el *loop* FG connector (**figura 19**) (Patzke et al., 2010).

Les interaccions involucrades en la interfície del dímer són: quatre ponts salins entre els residus D45 i K123, i els residus E56 i K121; dos ponts d'hidrogen entre el grup hidroxil del residu Y83 i el grup carbonil del residu P126; i dues interaccions hidrofòbiques entre Y83 amb P126 i A125, i V128 amb V70 i L73 (Patzke et al., 2010).

El domini IgC2 format pels aa 139-230 estan disposats en una conformació de β -sandvitx els quals dues làmines β estan formades per tres cadenes- β antiparal·leles A/B/E i C/F/G, respectivament (**figura 19**). Dos ponts disulfurs uneixen les làmines- β connectant les cadenes- β A amb la G, i la B amb la F.

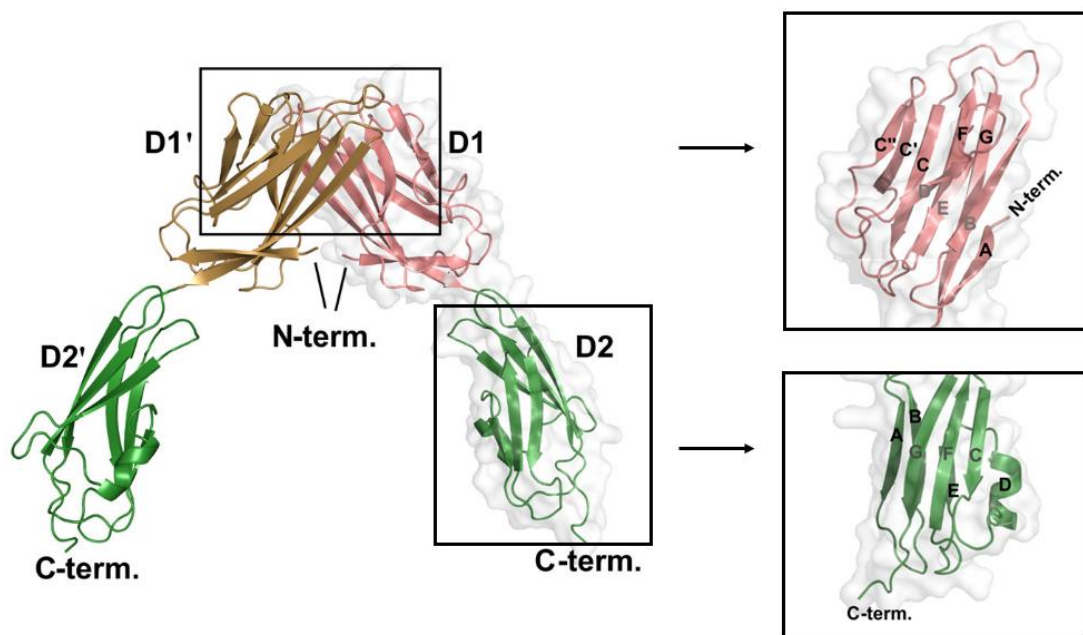


Figura 19. Estructura per cristal·lografia de la regió extracel·lular de la proteïna CAR. Dues molècules CAR interaccionant en cis formant un dímer en forma de U a través del domini D1. Figura adaptada de (Patzke et al., 2010).

La proteïna CAR és capaç de formar interaccions homofíliques a través del domini IgV i IgC2, i també forma interaccions heterofíliques a través del domini IgC2. Estudis de cristal·lografia, només han permès obtenir l'estructura tridimensional de la regió extracel·lular de la proteïna CAR formant homodímers, amb forma de U, a través de la interacció dels dominis IgV. Tot i així, experiments d'unió i adhesió indiquen que tot dos dominis *Ig-like* estan implicats en la interacció homofílica i que els monòmers de la proteïna CAR poden presentar altres conformacions quan formen homodímers. Un fet que reforça aquesta idea és la flexibilitat que presenta l'ectodomini de la proteïna CAR el qual permetria diferents conformacions per les interaccions cis i trans (**figura 20**) (Berezin & Walmod, 2014; Patzke et al., 2010).

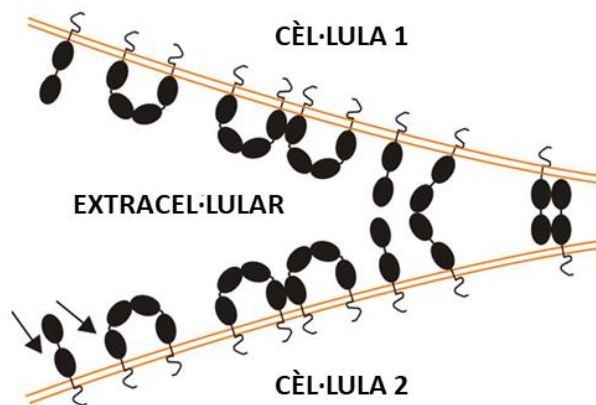


Figura 20. Representació de les possibles interaccions de la proteïna CAR a la membrana plasmàtica. Possible interacció homofílica en forma de U a través del domini D1 revelada per cristal·lografia. Un altre possible interacció homofílica entre dues molècules CAR a través dels dominis D1 i D2. Finalment, interaccions heterofíliques amb les glicoproteïnes de la ME senyalades amb fletxes. Figura adaptada de (Patzke et al., 2010).

A part de les interaccions homofíliques, la proteïna CAR també té la capacitat de formar interaccions heterofíliques a través del domini IgC2; per exemple, amb les glicoproteïnes de la matriu extracel·lular: la fibronectina, el LN-1, la tenascina-R i l'agrina; tot i que actualment no és coneix les implicacions biològiques d'aquestes interaccions. També s'han descrit interaccions heterofíliques amb les molècules d'adhesió JAM-L, JAM-C i amb les integrines (Patzke et al., 2010).

Per altra banda, es suggereix que la proteïna CAR interacciona, a través d'un motiu d'unió PDZ classe I, amb diferents molècules intracel·lulars de senyalització, indicant que CAR està present a la membrana plasmàtica en grans complexes de proteïnes. Algunes de les proteïnes identificades que interaccionen amb CAR són: ZO-1 (*Zona Occludens-1*), MUPP-1 (*MULTI-PDZ domain Protein-1*), MAGI-1b (*Membrane Associated Guanylate*

kinase), PICK-1 (*Protein Interacting with C Kinase 1*), PSD-95 (*PostSynaptic Density protein 95*), LNX i LNX2 (*Ligand of Numb protein X*) (Matthäus et al., 2017).

En les cèl·lules epitelials, CAR es concentra a la membrana basolateral de les unions intercel·lulars on actua com a un component de les unions estretes a través de la interacció amb ZO-1 o MUPP-1 (Matthäus et al., 2017).

2.3.2 Característiques estructurals de les molècules JAM (*Junctional Adhesion Molecules*).

Les proteïnes JAM (de l'anglès *Junctional Adhesion Molecule*) són molècules d'adhesió que pertanyen a la IgSF. Participen en una àmplia varietat de processos biològics com la inflamació, l'angiogènesi, l'hemostàsia, la formació de la barrera epitelial, l'hematopoesi, el desenvolupament de les cèl·lules germinals i el desenvolupament del sistema nerviós.

S'han identificat tres JAMs anomenades JAM-A, JAM-B i JAM-C que presenten una elevada identitat entre si, aproximadament el 35%. Per altra banda, també s'han identificat, les JAM-4 i JAM-L que presenten una identitat al voltant d'un 14-18% amb les altres 3 JAMs. Els diferents homòlegs presenten un patró d'expressió cel·lular propi. JAM-A s'expressa a les plaquetes, neutròfils, monòcits, limfòcits i eritròcits; JAM-B només s'expressa en cèl·lules endotelials; i JAM-C s'expressa en cèl·lules endotelials i leucòcits. El patró de les JAM-4 i JAM-L no està del tot definit (Mandell & Parkos, 2005).

A nivell estructural, les proteïnes JAM són glicoproteïnes TM tipus I, compostes per una gran regió extracel·lular que presenta dos dominis *Ig-like*, un domini transmembrana, i una petita cua citoplasmàtica. El domini *Ig-like* més llunyà de la membrana plasmàtica rep el nom de D1 i el més pròxim D2. Una diferència estructural entre els homòlegs és el tipus de domini *Ig-like* que presenten. En el cas de la JAM-A i JAM-4 els dos dominis *Ig-like* són de tipus V. En canvi, les JAM-B, JAM-C i JAM-L el domini D1 és de tipus variable (IgV) i el domini D2 és de tipus constant (IgC2) (Mandell & Parkos, 2005).

Les proteïnes JAMs tenen la capacitat de formar interaccions homofílques i heterofílques. En tots dos casos, la interacció pot ser en cis (en la mateixa cèl·lula) i en trans (en diferents cèl·lules). En aquest apartat, ens centrarem en descriure les característiques estructurals de la proteïna humana JAM A, o també anomenada JAM-1, resolta per cristal·lografia (Prota et al., 2003).

L'estructura tridimensional de JAM-1 humana, mostra que el domini *Ig-like* més distant de la membrana plasmàtica és de tipus variable (IgV), ja que està format per dues làmines- β antiparal·leles compostades per les cadenes- β A/B/E/D i G/F/C/C'. En canvi, el domini *Ig-like* més pròxim a la membrana plasmàtica és de tipus intermedi (Igl), ja que la cadena- β C' és més curta, i no presenta la cadena- β C''. Tots dos dominis *Ig-like* presenten el clàssic pont disulfur entre les cadenes- β B i F. A més, l'estructura tridimensional mostra un angle de 125° entre els dos dominis *Ig-like* (Prota et al., 2003) (**figura 21A i B**).

La superfície d'interacció que es dona entre dues molècules JAM-1, per la formació de l'homodímer, es troba localitzada a la làmina- β G/F/C/C' del domini D1. La superfície d'interacció està formada per 4 ponts salins entre els residus R59-E61, E61-R59, L63-E121, E121-L63; contactes hidrofòbics entre els residus L72-T119, M110-M110 i T119-L72; i ponts d'hidrogen en els residus T75-E114 (**figura 21C**) (Prota et al., 2003).

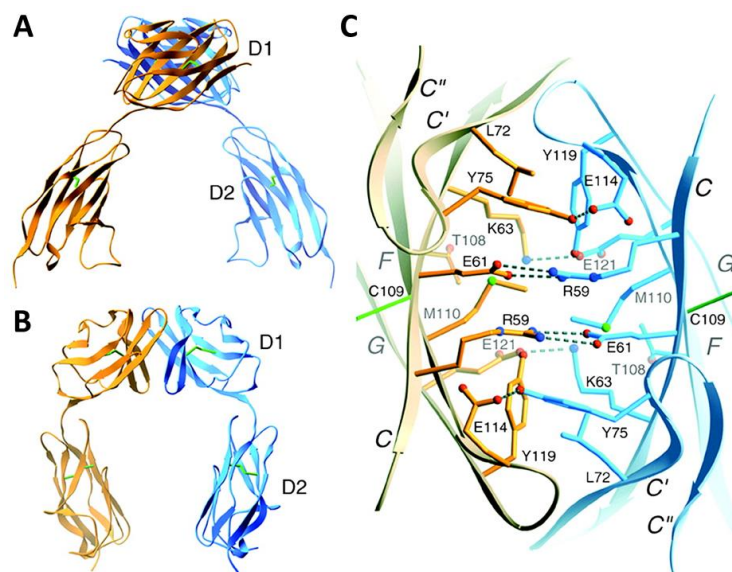


Figura 21. Estructura del dímer JAM1 humana interaccionant a través del domini D1. A i B) Un monòmer de JAM representat en taronja i l'altre en blau. **C)** Superfície d'interacció entre els dos monòmers JAM. La superfície d'interacció està formada per les làmines- β G/F/C/C' del domini D1 de cada monòmer. Els ponts d'hidrogen i els ponts salins estan representats amb línies discontinues. Figura extreta de (Prota et al., 2003).

JAM-A, -B i -C interactuen amb altres proteïnes de membrana tan en cis com en trans en una àmplia varietat de tipus cel·lulars. Les interaccions trans inclouen proteïnes que pertanyen a IgSF, altres membres de la família JAM i integrines. Per altra banda, les interaccions cis inclouen integrines i tetraspanines. Tot i que es desconeix el mecanisme exacte que utilitzen les JAMs per dur a terme les diferents funcions, existeixen evidències que suggereixen que les interaccions homofílques i heterofílques són importants per poder realitzar les diferents funcions.

Totes les proteïnes, que interaccionen amb les JAM, tenen en comú que contenen un o varis dominis d'interacció proteïna-proteïna (domini PDZ, domini SH3, domini GuK, domini L27, dominis WW). Normalment, les proteïnes que presenten varis dominis d'interacció proteïna-proteïna acostumen a formar grans complexos proteics durant processos de senyalització. El fet que les proteïnes JAM interaccionin directament amb un ampli ventall de proteïnes, suggereix que les JAMs serveixen per formar o reclutar grans complexos de senyalització a les unions cel·lulars (Ebnet, 2017).

3. POSSIBLE FUNCIO BIOLÒGICA DE LA PROTEÏNA MLC1.

En el dia d'avui, es desconeix la funció de la proteïna MLC1. Inicialment, es pensava que podia ser un canal o un transportador degut a la seva capacitat d'homooligomeritzar (Capdevila-Nortes et al., 2012; Teijido et al., 2004), comportament típic que presenten varis canals de ions (Park et al., 2017); i per la lleugera homologia, que presentaven els anàlisis de la seqüència primària de MLC1, amb el canal de potassi Kv1.1 (Teijido et al., 2004). Tot i així, la seqüència primària de MLC1 no presentava el motiu GYG encarregat de formar el porus del canal, i estudis de *voltatge-clamp* en oòcits i *patch-clamp* en cèl·lules HEK293 no mostraven cap corrent de MLC1 (Teijido et al., 2004).

Com s'explicarà més detalladament en la discussió, dades d'homologia estructural, obtingudes a partir del model bioinformàtic del monòmer de MLC1 generat pel *software AlphaFold2*, indicaven una elevada similitud estructural amb sensors o proteïnes emmagatzemadores de ions. Tanmateix, la localització als peus astrocitaris pròxims a la barrera hematoencefàlica (Teijido et al., 2004) indicaven la seva participació en la regulació de ions o altres substàncies. Aquestes dades, amb combinació amb l'elevat increment d'aigua a la substància blanca que presenten els pacients afectats per MLC, suggerien que la proteïna MLC1 podria tenir una funció de sensor de ions involucrada en la modulació de l'aigua i l'homeòstasi iònica cerebral.

En aquest capítol, explicarem les característiques estructurals i el mecanisme de proteïnes que probablement tenen una funció similar a la proteïna MLC1. Específicament ens centrarem en sensors de membrana i les tetraspanines.

3.1 SENSORS.

Les membranes biològiques presenten una complexa organització de proteïnes i lípids que col·lectivament determinen les seves propietats fisicoquímiques. La topologia, la localització i l'activitat de les proteïnes de membrana estan afectades pel context que les envolta. Per tant, les membranes biològiques requereixen mecanismes sofisticats que detectin les diferents condicions en que es troben i que provoquin una determinada resposta, permetent l'adaptació a la nova situació (Covino et al., 2018).

Els sensors són proteïnes que tenen la capacitat de detectar estímuls específics, permetent que la cèl·lula respongui d'una manera determinada segons el context en que es troba. Existeixen una ampla gamma de sensors que detecten un ampli ventall d'estímuls. En aquest apartat, ens centrarem en explicar els sensors de ions clorur, els sensors de ions potassi i la regió sensora dels canals dependents de voltatge, ja que pensem que són les tres condicions que podrien estar influïnt en la proteïna MLC1.

3.1.1 Sensor de ions clorur.

Les quinases WNK (de l'anglès *With No lysine (K)*) són una família de quatre quinases serina/treonina (WNK1-4) caracteritzades per no conservar la lisina catalítica, situada en la posició 72 (K72), present en totes les quinases. Participen en una àmplia gamma de processos biològics, incloent: el control del volum cel·lular, el transport transepitelial de ions i el desenvolupament d'òrgans (Chen et al., 2019). Tot i així, recents estudis estructurals i diferents assajos *in vitro* suggereixen la seva funció com a sensor dels ions clorur (Piala et al., 2014).

La seva funció consisteix en regular l'activitat del co-transportador NCC (de l'anglès *Na⁺-Cl⁻ Cotransporter*), encarregat de la reabsorció dels ions de sodi en el túbul contort distal, per mantenir l'homeòstasi dels ions sodi i potassi (Chen et al., 2019). L'unió dels ions clorur a la proteïna WNK provoca la pròpia inhibició de WNK1, impedit la seva activació a través de l'autofosforilació de la serina 382 (S382) (Piala et al., 2014).

Estudis de l'estructura cristal·litzada de la proteïna WNK1 mostren la detecció dels ions clorur a través de la cadena principal de les amides de la leucina 369 (L369) i el residu adjacent glicina 370 (G370) (**figura 22A**). La L369 forma part del motiu DLG que està conservat en totes les quinases WNK, i la G370 forma part de la hèlix α 3/10 localitzada a la N-terminal del *loop* d'activació. Cap altre de les altres α 3/10 presenta unió amb un anió o molècules d'aigua. El ió clorur forma interaccions hidrofòbiques amb la fenilalanina 283 (F283), la leucina 299 (L299), la leucina 369 (L369) del motiu DLG i la leucina 371 (L371) de la hèlix α 3/10 (**figura 22B**). Per tant, el lloc d'unió al ió clorur està compost per una combinació de varies interaccions amb les cadenes de varis residus i contactes hidrofòbics (Piala et al., 2014).

L'unió del ió clorur provoca canvis conformacionals de la hèlix α 3/10 que contribueix a la configuració inactiva de la proteïna WNK1, provocant un canvi posicional dels residus catalítics treonina 386 (T386) i el glutàmic 268 (E268) (Piala et al., 2014). Hèlix similars han estat identificades en la conformació inactiva de varies quinases, i s'han observat com un mecanisme comú que contribueix a la configuració inactiva de les molècules (Jura et al., 2011).

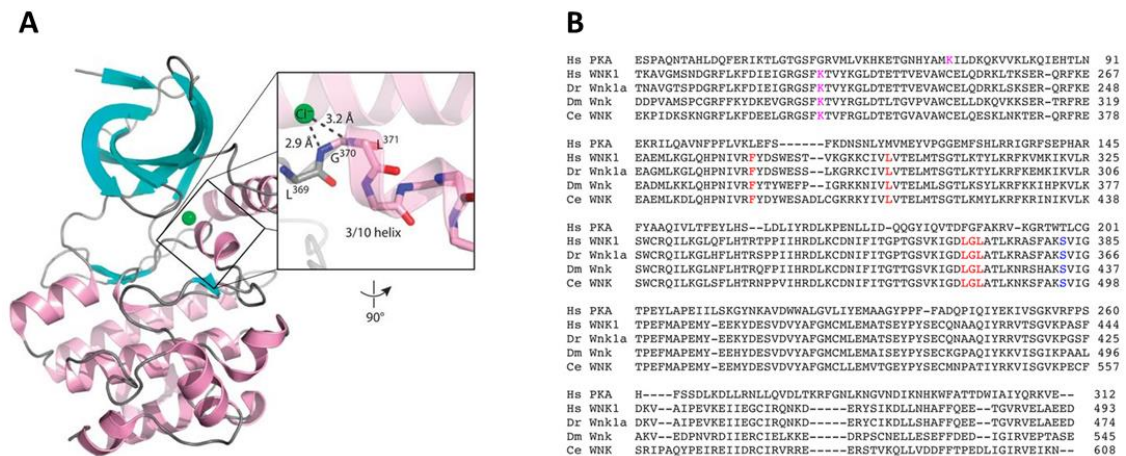


Figura 22. Característiques estructurals de les quinases WNK. A) Estructura de la proteïna WNK1 acolorint les hèlix α en rosa, les làmines β en cian, els loops en gris i el ió clorur en verd. Ampliació de la zona de la hèlix α 3/10, representat la distància dels ponts d'hidrogen amb el ió clorur. **B)** Alineament dels dominis quinasa de WNK1 humana (Hs WNK1), peix zebra (Dr Wnk1a), *Drosophila melanogaster* (Dm Wnk), cuc (Ce WNK) amb la proteïna quinasa A (Hs PKA). Atípica disposició de la lisina del subdomini II al subdomini I indicada en magenta. Residus que s'uneixen amb el ió clorur marcats en vermell. Lloc d'autofosforilació necessari per l'activació de la quinasa indicat amb blau. Figures extretes de (Piala et al., 2014).

3.1.2 Sensor de ions potassi.

La proteïna Kbp (de l'anglès *K⁺ binding protein*) és una proteïna citosòlica present en *Escherichia coli* que permet el creixement normal en condicions d'elevada concentració de ions potassi i en condicions d'estrès osmòtiques induïdes per salts, mantenint una concentració de ions potassi intracel·lular adequada.

La proteïna Kbp està composta per un domini BON (de l'anglès *Bacterial OsmY and Nodulation*) localitzat a l'extrem N-terminal, i un domini LysM (de l'anglès *Lysin Motif*) localitzat a l'extrem C-terminal. El domini BON està format per tres làmines β i dues hèlix α , on la segona hèlix α uneix la segona i la tercera làmina β , adoptant una topologia de

α - β - β - α - β . Per altra banda, el domini LysM està format per dues làmines β antiparal·leles que per un costat formen una petita zona hidrofòbica i per l'altre estan unides a les dues hèlix α quasi perpendiculars (**figura 23A**).

Anàlisis biofísics i estructurals mostren que la majoria dels llocs d'unió a ions potassi que presenta la proteïna Kbp es localitzen en el domini BON, i el domini LysM presenta una funció estabilitzadora. L'unió dels ions potassi provoca un canvi conformacional de la proteïna, fent que ambdós dominis (BON i LysM) es compactin entre ells, adquirint una forma globular. En canvi, en absència de ions potassi la proteïna presenta una conformació menys globular i una regió extensa (**figura 23B**).

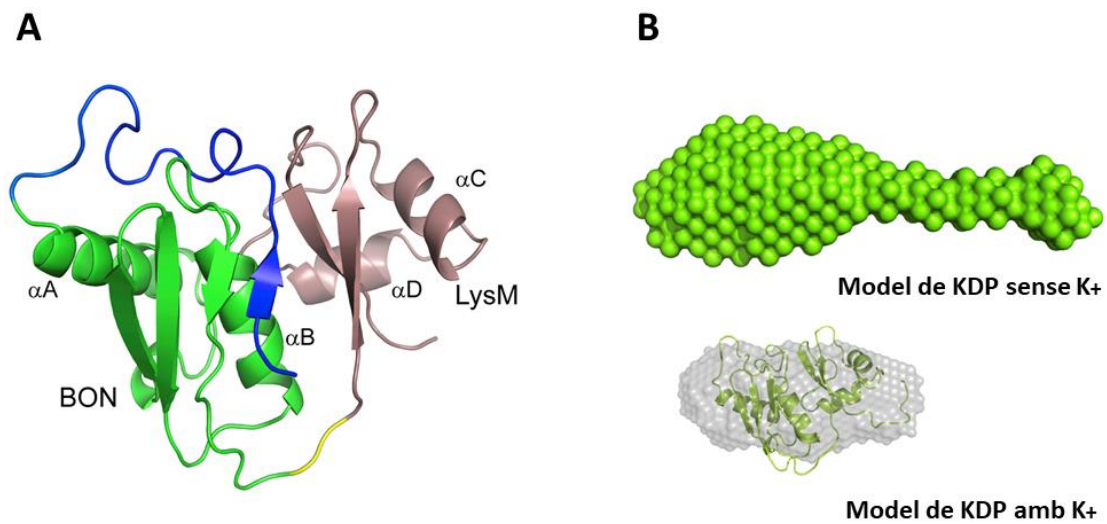


Figura 23. Estructura de la proteïna Kbp. **A**) Representació estructural de la proteïna Kbp amb els dominis BON i LysM acolorits amb verd i marró, respectivament. L'extensió N-terminal està acolorits amb blau i la regió d'unió entre els dominis BON i LysM acolorida amb groc. **B**) Model de Kbp amb la presència de ions potassi (K^+) sobrepassant l'estructura NMR (a dalt) i el model de Kbp amb l'absència de K^+ . Figura adaptada de (Ashraf et al., 2016).

3.1.3 Proteïnes dependents de voltatge.

Les cèl·lules estan delimitades per una membrana lipídica que separa el medi extracel·lular del medi intracel·lular. Els gradients iònics, que hi ha a la membrana plasmàtica, generen un potencial de membrana que regula la funció d'un gran nombre de proteïnes de membrana com els canals iònics, els transportadors, els receptors, els enzims i les proteïnes d'adhesió. Aquest grup de proteïnes són proteïnes de membrana

sensibles al voltatge que tenen la capacitat de transformar els canvis del potencial de membrana que detecten en canvis conformacionals (Kasimova et al., 2018).

El mecanisme com les proteïnes detecten el voltatge és divers, per exemple les proteïnes poden presentar:

- a) Regions amb residus carregats com l'aspàrtic, el glutàmic, l'arginina, la lisina i la histidina que davant d'un canvi de voltatge poden reorientar-se i provocar canvis en la conformació de la proteïna. Aquest mecanisme de detecció del voltatge és típic de canals de ions dependents de voltatge (**figura 24A**).
- b) Cadenes laterals que presentin un moment dipolar elèctric de manera intrínseca, com la tirosina, poden reorientar-se degut a canvis en el camp elèctric (**figura 24B**).
- c) Estructures d'hèlix α que presentin un moment dipolar elèctric de manera intrínseca. Representen una estructura potencial, que al reorientar-se, pot canviar la conformació de la proteïna (**figura 24C**).
- d) Cavitats dins de la pròpia proteïna on ions lliures poden ser associats. Canvis del camp elèctric poden fer moure els ions provocant un canvi conformacional de la proteïna. Aquest mecanisme s'ha observat en la bomba de sodi-potassi (**figura 24D**).

En tots els casos, la reorientació de la regió carregada, degut al canvi de voltatge, representa l'inici d'un moviment que està lligat a un canvi de conformació que regula la funció de la proteïna (Bezanilla, 2008).

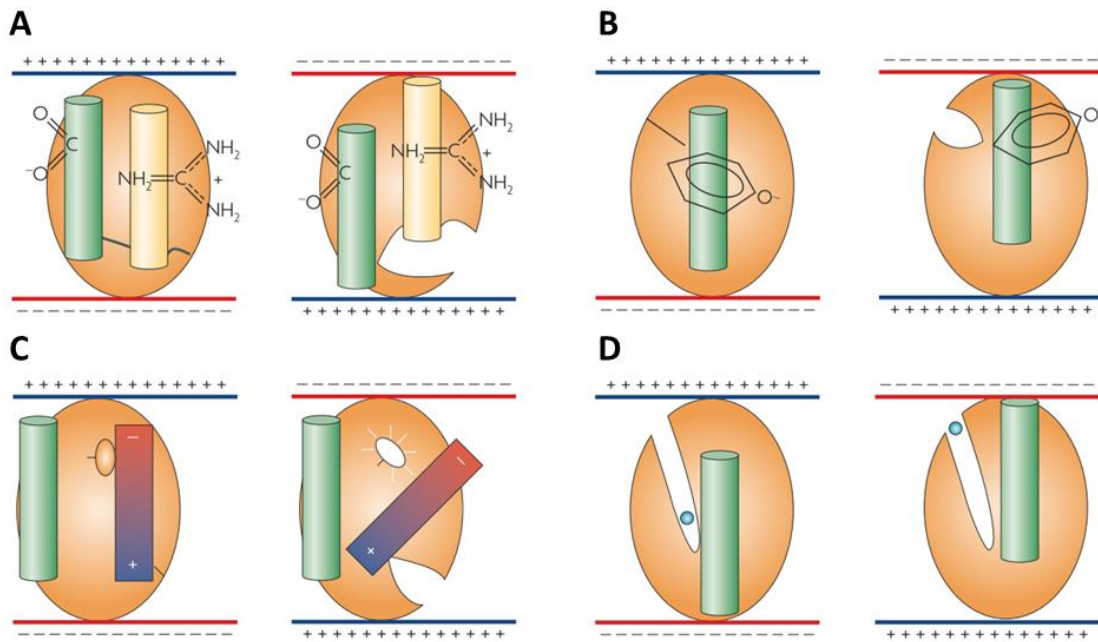


Figura 24. Representació esquemàtica de les possibles estructures de sensors de voltatge. Els diagrames mostren una hipotètica proteïna (taronja) i la formació d'un lloc actiu produït pel canvi de conformació a causa del voltatge detectat per regions de la proteïna (cilindres verds i grocs). **A)** Aminoàcids carregats poden desplaçar-se a causa de canvis en el voltatge (es mostren l'asparagina i l'arginina). **B)** Reorientació d'un residu dipol, com la tirosina, a causa de canvis en el voltatge. **C)** Una hèlix α pot ser un domini dipol en la membrana plasmàtica (gradient blau i vermell) provocant una reorientació davant d'un canvi de voltatge. **D)** Un canal dins de la proteïna pot redistribuir els ions que conté (cercle blau) a causa d'un canvi de voltatge i provocar canvis conformacionals a la proteïna. Figura extreta de (Bezanilla, 2008).

Els canals de ions de sodi, calci i potassi dependents de voltatge són essencials en la excitabilitat de la cèl·lula, ja que formen la base de la iniciació i la propagació del impuls nerviós (Bezanilla, 2008). Degut a la similitud estructural que presenten entre si, ens centrarem en els canals de potassi dependents de voltatge, explicant les característiques estructurals que defineixen el porus per on passen els ions de potassi i el mecanisme per detectar els canvis de voltatge.

3.1.3.1 Els canals de potassi dependents de voltatge.

Els canals de potassi dependents de voltatge formen una estructura tetramèrica, composta per quatre subunitats idènticament plegades, que formen un porus central per on els ions de potassi passen. Cada subunitat està formada per sis segments TM (S), els quatre primers segments (S1-S4) formen el sensor de voltatge, i els dos últims segments (S5 i S6) formen el porus selectiu conductor de ions (Kim & Nimigeon, 2016).

L'estructura general del porus, que comparteixen els diferents canals de potassi, va ser caracteritzada gràcies a la resolució per cristal·lografia de l'estructura del canal de potassi bacterià KcsA, permetent entendre el mecanisme de selectivitat pels ions de potassi (Doyle et al., 1998) (**figura 25**). Aquests resultats mostraven que la dimensió del porus era d'aproximadament 3 Å, i que el lloc actiu dels canals de potassi estava compost per uns aminoàcids altament conservats dins del porus TVGYG anomenada en anglès *signature sequence* (Sansom et al., 2002). La regió del porus era curta i presentava quatre llocs d'unió pels ions potassi formats pels oxígens dels grups carboxils dels residus que composaven la *signature sequence* (TVGYG), els quals estaven encarats cap el centre del porus. Aquests quatre llocs d'unió permeten coordinar en una única fila el pas dels ions potassi per la membrana plasmàtica, fet que explicava la gran velocitat de flux que presenten els canals de potassi, tot i la seva elevada selectivitat. A més, la distància dels àtoms d'oxigen, que presenten els grups carboxils del porus respecte els ions de potassi deshidratats, mimetitzen la hidratació dels ions potassi en solució, fet que augmenta la selectivitat pels ions potassi, ja que els àtoms d'oxigen estan massa lluny per mimetitzar la hidratació dels ions petits, com per exemple el sodi (Kim & Nimigean, 2016; Kuang et al., 2015; Sansom et al., 2002).

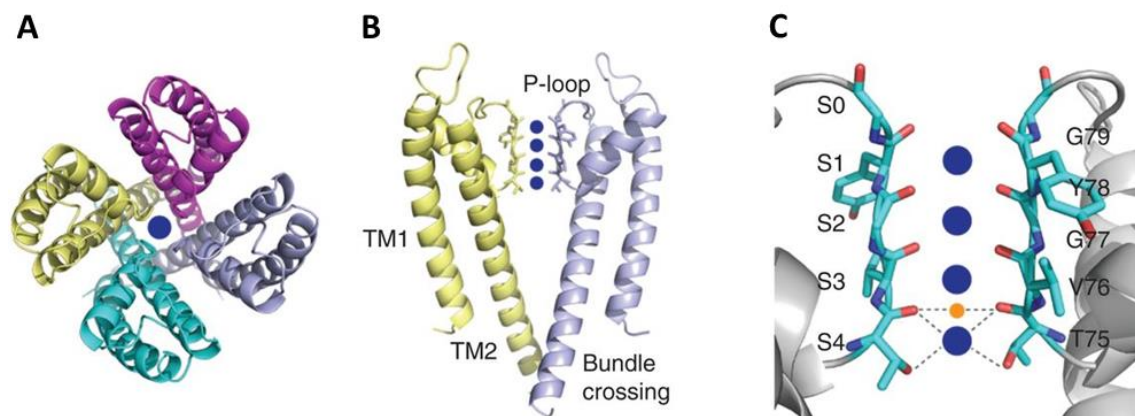


Figura 25. Estructura del canal de potassi KcsA. **A)** Homotetràmer de KcsA vist des de dalt. Cada subunitat està pintada d'un color. El porus central format per les quatre subunitats de KcsA es mostra amb un ió de potassi (cercle blau). **B)** Visió del homotetràmer de KcsA vist lateralment on s'han tret dues subunitats per veure-ho amb més claredat. El loop-P forma el porus on es mostren quatre ions de potassi (cercles blaus). **C)** Visió detallada del porus on es mostra la signature sequence TVGYG. Les línies discontinues representen la coordinació dels ions de potassi i els oxígens en el segment 4 (S4). Figura extreta de (Kim & Nimigean, 2016).

Com s'ha comentat anteriorment, els canals de potassi dependents de voltatge presenten un sensor de voltatge format des del S1 fins el S4. Aquest sensor està

localitzat a la perifèria del canal, i permet la obertura o el tancament del canal. En tots els canals de ions dependents de voltatge, el S4 presenta varis aminoàcids carregats positivament (arginina i lisina) els quals estan separats per dos aminoàcids hidrofòbics. Aquestes repeticions, que reben el nom de VSD (de l'anglès *Voltatge Sensing Domain*), estan altament conservades i són necessàries per detectar el voltatge (Kuang et al., 2015) (figura 26).

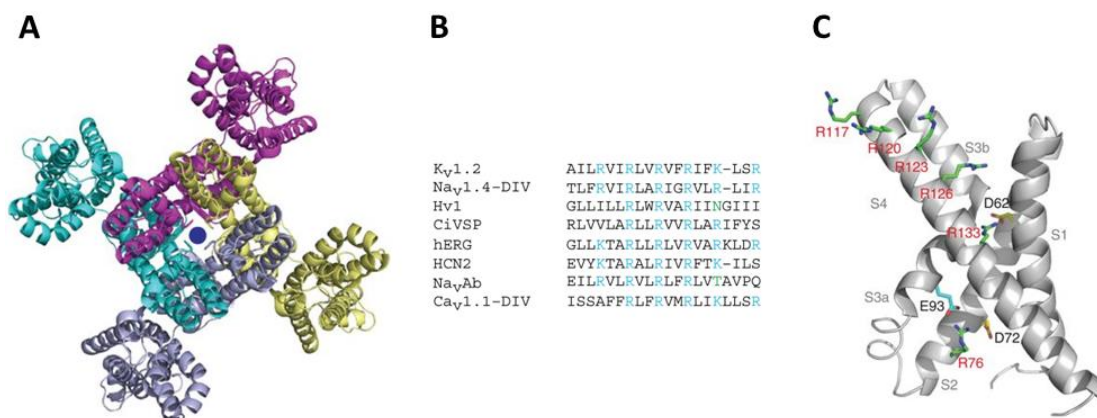


Figura 26. Estructura dels canals de potassi Kv. **A)** Visió des de dalt de l'homotetràmer del canal Kv1.2. Cada subunitat, representada amb color diferent, està formada per 6 segments transmembrana (S1-S6) on els S1-S4 formen el sensor de voltatge localitzat fora del porus central i, els S5 i S6 formen el porus central compost per les quatre subunitats de Kv. En el centre del canal es mostra un ió de potassi (cercle blau). **B)** Alineament de la seqüència del S4 de diferents membres de canals de ions dependents de voltatge. Els aminoàcids carregats positivament i conservats estan marcats amb blau. **C)** Visió detallada de l'estructura del sensor de voltatge del canal KvAP. Arginines del S4 estan representades amb verd i escrites en vermell. Figura adaptada de (Kim & Nimigeon, 2016).

Estudis del canal de potassi *Shaker* mostren que les càrregues positives de les arginines i lisines, que componen el VSD, estan exposades cap el medi intracel·lular a potencials negatius i cap el medi extracel·lular a potencials positius. D'aquesta manera, l'augment de ions positius al medi intracel·lular, que es dona durant la despolarització, provoca una repulsió amb les càrregues positives que presenten les arginines i les lisines del S4 reorientant-se cap el medi extracel·lular. El canvi d'orientació d'aquest residu provoca un desplaçament del S4, que provoca un canvi conformatiu de la proteïna, adoptant una conformació oberta on els ions potassi poden sortir cap el medi extracel·lular. A mesura que els ions potassi surten de la cèl·lula el medi intracel·lular es torna més negatiu i el medi extracel·lular més positiu. En algun punt, els residus d'arginina es senten més atrets per la càrrega negativa del interior cel·lular provocant una reorientació del S4 canviant la conformació de la proteïna que adopta una conformació

tancada. Aquest model suggereix que els canvis conformacionals són deguts per interaccions electrostàtiques favorables entre el medi extracel·lular i intracel·lular, i les arginines del S4, sense necessitar energia (Kim & Nimigean, 2016).

3.2 Tetraspanines.

Les tetraspanines són una superfamília de proteïnes de membrana que estan involucrades en varis aspectes de la biologia cel·lular i la fisiologia. Tendeixen a associar-se lateralment entre si i a agrupar-se dinàmicament amb diferents proteïnes, permetent que duguin a terme la seva funció. Per tant, actuen com a organitzadores moleculars de la membrana plasmàtica formant plataformes dinàmiques que reben el nom amb anglès *tetraspanin-enriched microdomains* (TEMs) o xarxa de tetraspanines (de l'anglès *tetraspanin web*) (Hemler, 2005).

A nivell estructural, estan formades per quatre dominis transmembrana (TM), un petit *loop* extracel·lular entre els TM 1 i 2 (EC1), un gran *loop* extracel·lular entre els TM 3 i 4 (EC2), un petit *loop* intracel·lular, i els extrems N- i C-terminal són intracel·lulars. A més, per formar part de la superfamília de les tetraspanines han de presentar 4-6 cisteïnes extracel·lulars conservades que formen els llocs de palmitoilació i residus polars en els TM (Stipp et al., 2003).

En general, els dominis extracel·lulars (EC1 i EC2) no estan tan conservats com els dominis TM i les regions intracel·lulars. Tot i així, les tetraspanines presenten uns residus altament conservats entre els aminoàcids 70 i 140 del domini EC2; incloent el motiu CCG, un altre cisteïna pròxima al TM 4 (en el 100% de les tetraspanines) i el motiu PXXC (en el 94% de les tetraspanines). Aquestes quatre cisteïnes formen ponts de disulfurs intracel·lulars essencials pel correcte plegament del domini EC2. Algunes tetraspanines també presenten un altre parell de cisteïnes que possiblement formen un tercer pont disulfur (Hemler, 2001).

Com s'ha comentat anteriorment, els dominis TM de les tetraspanines presenten un elevat grau de conservació. Probablement, les interaccions entre tetraspanines, essencials per la formació de la xarxa de tetraspanines, es duen a terme mitjançant

interaccions hidrofòbiques a través dels dominis TM. Els TM 1, 3 i 4 presenten residus altament polars (asparagina, glutamina i glutàmic) que estan conservats entre el 70-90% de les tetraspanines. Aquests residus polars podrien estar formant ponts d'hidrogen entre si o amb altres residus, estabilitzant els dominis TM; o bé, formar ponts d'hidrogen amb altres tetraspanines afavorint la dimerització o la multimerització (Senes et al., 2001).

Per altra banda, presenten cisteïnes intracel·lulars altament conservades localitzades a prop dels quatre dominis TM. Aquestes cisteïnes són llocs de palmitoilació necessaris per la correcta interacció entre tetraspanines i amb altres proteïnes. Estudis de mutagènesi dels llocs de palmitoilació de les tetraspanines CD151 (Berditchevski et al., 2002) i CD9 (Charrin et al., 2002) mostren una disminució de les associacions laterals amb altres tetraspanines, indicant la seva importància en la formació de la xarxa de tetraspanines. Aquests estudis suggereixen que la palmitoilació possiblement només es requereix a l'inici de la formació de la xarxa de tetraspanines (Berditchevski et al., 2002).

Finalment, la regió citoplasmàtica divergeix entre les diferents tetraspanines suggerint que duen a terme diferents funcions. En algunes tetraspanines, com la CD63, CD82, CD37, CD151, presenten a l'extrem C-terminal el motiu YXXØ essencial per la correcta localització a compartiments intracel·lulars, on Ø representa un aminoàcid amb una cadena lateral voluminosa i hidrofòbica. Les tetraspanines que no presenten aquest domini poden localitzar-se igualment en compartiments intracel·lulars a través d'interaccions amb altres tetraspanines que si que presentin aquest motiu. Aquest fet explicaria l'elevada localització de tetraspanines als compartiments intracel·lulars com els endosomes, els lisosomes i els exosomes (Bonifacino & Dell'Angelica, 1999; Escola et al., 1998).

La tetraspanina CD81 forma un complex multiproteic amb CD19, CD21/CR2 i CD225 per regular la funció del receptor de les cèl·lules B. Estudis de cristal·lització han resolt l'estructura tridimensional (3D) de la tetraspanina CD81, i han permès obtenir un model de la funció de les tetraspanines (Zimmerman et al., 2016).

La resolució 3D de l'estructura de CD81 permet observar que els quatre dominis TM adquireixen una conformació en forma de con, delimitant una cavitat que es coberta pel

domini EC2. Els dominis TM es disposen en dos parells d'hèlix antiparal·leles separades entre si, un parell la conformen el TM1/TM2 i l'altre parell el TM3/TM4. Els dos parells d'hèlix només convergeixen a prop de la regió citoplasmàtica de la membrana a través de contactes entre el TM 2 i el TM 3 (**figura 27**) (Zimmerman et al., 2016).

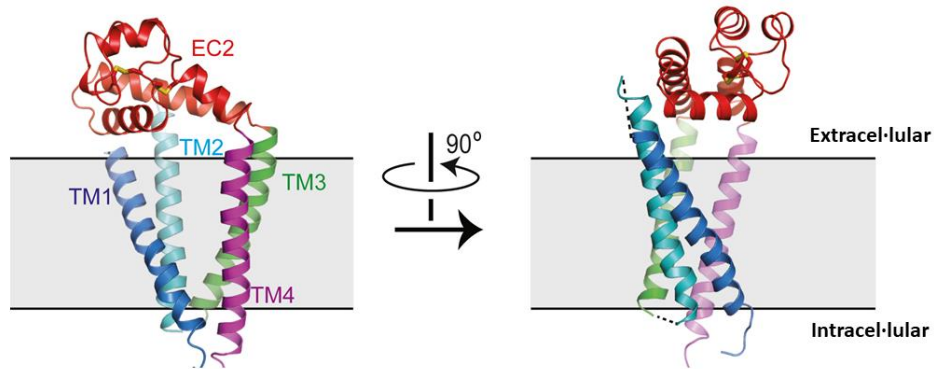


Figura 27. Estructura tridimensional de la tetraspanina humana CD81. Representació de la tetraspanina CD81 a la membrana plasmàtica, senyalant: la regió transmembrana (hèlix α 1 (TM1) en blau, hèlix α 2 (TM2) en cian, hèlix α 3 (TM3) en verd, hèlix α 4 (TM4) en lila) i el gran loop extracel·lular (EC2) entre el TM3 i el TM4 en vermell. Figura adaptada de (Zimmerman et al., 2016).

Anàlisi de la cavitat hidrofòbica, delimitada pels quatre dominis TM, mostren que CD81 s'uneix específicament a colesterol, estabilitzant la seva conformació tancada. En canvi, l'absència de colesterol afavoreix la conformació oberta de CD81 (**figura 28**). Aquests estudis proposen una modulació de la conformació de les tetraspanines en resposta a diferents concentracions de colesterol, explicant com les tetraspanines regulen la localització subcel·lular de les diferents proteïnes depenent de la composició lipídica dels diferents compartiments de la membrana (Zimmerman et al., 2016).

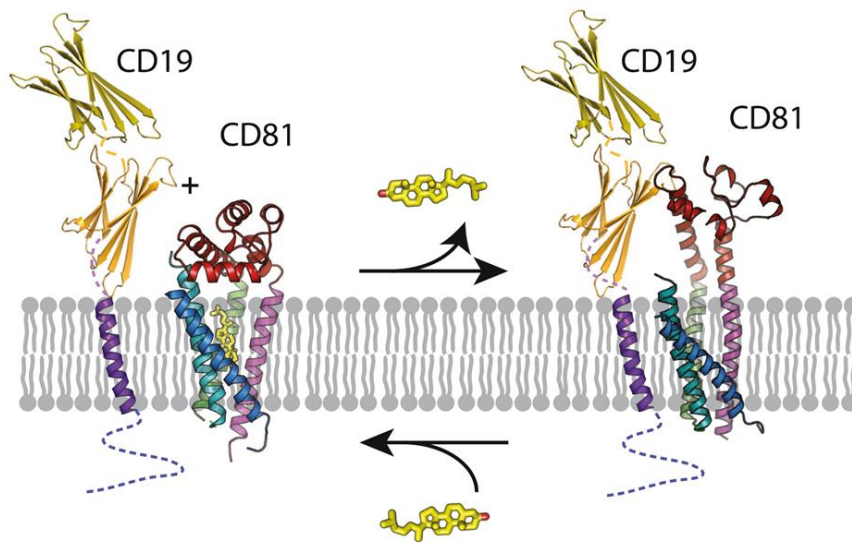


Figura 28. Representació del model proposat per la regulació de la tetraspanina CD81 amb la proteïna CD19 a través de l'unió amb el colesterol. L'unió del colesterol a CD81 afavoreix una conformació tancada, dificultant l'unió amb la proteïna CD19 (esquerra). En canvi, quan CD81 no està unit a colesterol s'afavoreix la conformació oberta, permetent una unió a CD19 més eficient (dreta). Figura extreta de (Zimmerman et al., 2016).

OBJECTIUS

La Leucoencefalopatia Megalencefàlica amb quists Subcorticals (MLC, de l'anglès *Megalencephalic Leukoencephalopathy with subcortical Cysts*) és una malaltia minoritària hereditària. Els gens responsables són *MLC1* i *GLIALCAM* que codifiquen per dues proteïnes de membrana que reben el mateix nom. Actualment, es desconeixen les funcions fisiològiques que desenvolupen ambdues proteïnes i els mecanismes patofisiològics de la malaltia. Per aquest motiu, no existeix cap intervenció terapèutica pels pacients afectats per MLC.

L'objectiu principal d'aquesta Tesi és augmentar el coneixement estructural de totes dues proteïnes amb la finalitat d'entendre la seva funció fisiològica.

1. Estudiar els dominis estructurals de la proteïna GlialCAM implicats amb interaccions amb ella mateixa i la proteïna MLC1.
2. Entendre les característiques bioquímiques de les mutacions del gen *GLIALCAM* que determinen el comportament hereditari recessiu o dominant de la proteïna GlialCAM.
3. Avançar en l'estructura tridimensional de la proteïna MLC1 i/o l'estructura del complex MLC1/GlialCAM per crio-microscòpia electrònica (Cryo-EM).

MATERIALS I MÈTODES

1. TÈCNiques DE BIOLOGIA MOLECULAR

Les tècniques de biologia molecular ens permeten introduir el nostre gen d'interès dins un vector de clonació, obtenint un vector d'expressió. El vector de clonació ha de complir tres característiques: a) Tenir el seu propi origen de replicació, és a dir, la capacitat de replicació autònoma i independent del genoma de l'hoste. b) Presentar llocs de clonació múltiple que permetin la obertura del DNA amb enzims de restricció, permetent la clonació d'inserts de DNA en la forma i la orientació adequada. c) Tenir marcadors genètics seleccionables que permetin aïllar les cèl·lules de l'hoste que continguin el vector.

1.1 LA REACCIÓ DE PCR.

La reacció en cadena de la polimerasa (de l'anglès *Polymerase Chain Reaction*, PCR) és una tècnica que ens permet amplificar selectivament fragments de DNA de manera exponencial, utilitzant oligonucleòtids encebadors, que posseeixen una seqüència complementària al fragment de DNA que es vol amplificar, i una polimerasa termoestable.

MATERIAL

- El kit *KOD Hot Start DNA polymerase* (Novagen) conté:
 - Tampó polimerasa 10x
 - 2 mM *dNTPs*
 - 25 mM $MgSO_4$
 - *KOD polymerase* 1 U/ μ L
- 10 μ M oligonucleòtids *Forward* i *Reverse*
- DNA (100 ng/ μ L)
- Aigua Milli-Q
- Termociclador
- Eppendorfs de 0,2 - 0,5 mL

PROTOCOL

1. En eppendorfs de 0,2 - 0,5 mL, afegir el següents volums de cada reactiu, fins arribar a un volum final de 50 µL:

- Tampó polimerasa 10x	5 µL
- 2 mM <i>dNTPs</i>	5 µL
- 25 mM MgSO ₄ :	3 µL
- KOD <i>polymerase</i> 1 U/µL	1 µL
- Oligonucleòtid <i>Forward</i> (10 µM)	1,5 µL
- Oligonucleòtid <i>Reverse</i> (10 µM)	1,5 µL
- DNA (100 ng/µL)	1 - 3 µL
- Aigua Milli-Q	X µL
Volum final	50 µL

2. Introduir els eppendorfs de 0,2 - 0,5 mL al termociclador i programar el termociclador amb les següents condicions:

Inici	2 minuts a 95°C
Desnaturalització	30 segons a 95°C
Hibridació	30 segons a 55°C
Elongació	1 minut i 30 segons a 70°C
Final de l'elongació	10 segons a 95°C
Final	Es deixa a 4°C

Nota: Tenir en compte que el temps d'elongació depèn de la longitud del fragment de DNA a amplificar, generalment 1 minut per 1 kb. I la temperatura d'hibridació depèn de la seqüència de l'encebador, es calcula en °C amb la següent formula:

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

1.1.1 Reacció de PCR recombinant o mètode SOE (*Splicing by Overlap Extension*).

La reacció de PCR recombinant o mètode SOE (de l'anglès *Splicing by Overlap Extension*) s'utilitza per introduir mutacions puntuals, insercions i/o delecions en el DNA.

Aquesta tècnica consisteix en realitzar PCRs parcials del DNA motlle utilitzant oligonucleòtids encebadors que incorporin la mutació d'interès. Els fragments de DNA obtinguts presenten una regió de solapament on es localitza la mutació, la qual serveix de motlle per la PCR de recombinació que uneix els diferents fragments de DNA utilitzant els oligonucleòtids encebadors dels extrems 5' i 3'.

Els oligonucleòtids encebadors utilitzats en les PCR parcials no són totalment complementaris a la seqüència del DNA motlle. Per aquest motiu, s'ha afegit 10% de DMSO per millorar les condicions d'hibridació.

Les PCRs parcials es duen a terme com s'explica en l'apartat 1.1.

La reacció de la PCR recombinant utilitzant el *kit KOD Hot Start DNA polymerase* és la següent:

1. En eppendorfs de 0,2 - 0,5 mL afegir el següents volums de cada reactiu, fins arribar a un volum final de 100 µL:

- Tampó polimerasa 10x	10 µL
- <i>dNTPs</i> (2 mM)	5 µL
- MgSO ₄ (25 mM):	6 µL
- <i>KOD polymerase</i> (1 U/µL)	2 µL
- Oligonucleòtid <i>Forward</i> (10 µM)	3 µL
- Oligonucleòtid <i>Reverse</i> (10 µM)	3 µL
- Fragment de DNA 1 (100 ng/µL)	7 µL
- Fragment de DNA 2 (100 ng/µL)	7 µL
- DMSO (100x)	10 µL
- Aigua Milli-Q	X µL
Volum final	100 µL

2. Introduir els eppendorfs de 0,2 - 0,5 mL al termociclador. Les condicions del termociclador són les mateixes que l'apartat 1.1.

El fragment de DNA obtingut de la PCR recombinant es corre en un gel d'agarosa i es purifica seguint els passos explicats en l'apartat 1.3. Finalment, el fragment de DNA que incorpora la mutació és clonat en el vector mitjançant el mètode clàssic (apartat 1.4) o el sistema *Gateway* (apartat 1.5.2).

1.2 ELECTROFORESIS DEL DNA.

L'electroforesi de DNA en gels d'agarosa no desnaturalitzants es realitza per validar la correcte integritat del DNA provinent d'una PCR, la qualitat d'una digestió amb enzims de restricció, o bé, per dur a terme la purificació de fragments de DNA. La migració del DNA és proporcional al seu pes molecular, que és analitzat amb marcadors de pes molecular conegut.

MATERIAL

- Cubeta d'electroforesi.
- Font de corrent elèctrica.
- TAE 50X (2M Tris-base, 1M àcid acètic, 50 mM EDTA)
- TAE 1X (TAE 50X diluït en H₂O)
- Tampó de carrega 6x (40 mM EDTA; 0,1% SDS; 30% Ficol 400; 0,2% blau de bromofenol).
- Gel d'agarosa al 1-2%, la concentració del gel varia depenent de la mida de les bandes de DNA. Afegir 1 µg/mL de bromur d'etidi.
- Marcador de pes molecular.

PROTOCOL

1. Preparar les mostres amb el tampó de carrega a una concentració final de 1X.
2. Preparar el gel d'agarosa al 1-2% diluït amb TAE 1X i afegir 0,5-1% de bromur d'etidi.
3. Carregar les mostres de DNA en el gel d'agarosa juntament amb el marcador de pes molecular. La electroforesi es realitza a 80-100 V controlant el front de migració.
4. Visualitzar les bandes en un *trans*-iluminador de llum ultraviolada.

1.3 PURIFICACIÓ DEL DNA.

La purificació del DNA es realitza per obtenir els fragments del DNA digerits de plàsmids o provinents d'una PCR, amb la finalitat d'introduir-los en el vector d'interès, és a dir efectuar una clonatge.

En primer lloc, es dur a terme una electroforesi en gel d'agarosa (apartat 1.2) per separar correctament la banda d'interès de la resta. Es recomana carregar una gran quantitat de DNA (en general, tota la quantitat obtinguda en la digestió o la PCR) perquè durant el procés de purificació es perd gran part del DNA. Tot seguit, la banda serà retallada amb un bisturí, sota la llum ultraviolada per poder visualitzar els fragments de DNA, i dipositada en un tub *ependorf* per dur a terme la purificació.

MATERIAL

- *kit comercial High pure PCR product purification kit* (Roche) que conté:
 - Columnes acoblades a tubs de 2 mL.
 - Tampó d'unió (3M guanidina-tiocianat, 10 mM Tris-HCl, 5% etanol (v/v), pH 6.6)
 - Tampó de rentat (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl pH 7.5). S'ha d'afegir etanol.
 - Aigua Milli-Q o tampó TE.

PROTOCOL

1. Afegir 500 µL del tampó d'unió al tub *ependorf* on tenim la banda tallada del DNA amb agarosa i incubar a 60°C fins que es dissolgui l'agarosa, aproximadament entre 5-15 minuts.
2. Transferir la mostra a una columna acoblada a un tub de 2 mL i incubar 1 minut a temperatura ambient.
3. Centrifugar la mostra a 17.900 x *g* durant 1 minut i descartar el sobrenedant.
4. Afegir 500 µL de tampó rentat i centrifugar a 17.900 x *g* durant 1 minut. Descartar el sobrenedant.

5. Afegir 250 μL de tampó rentat i centrifugar a 17.900 $\times g$ durant 1 minut. Descartar el sobrenedant.
6. Transferir la columna en un tub *ependorf* de 1,5 mL i eluir el DNA en 50 μL d'aigua Milli-Q centrifugant a 17.900 $\times g$ durant 1 minut.

1.4 DIGESTIÓ AMB ENZIMS DE RESTRICCIÓ.

Els enzims de restricció són endonucleases que tenen la característica de tallar el DNA per dianes específiques. Aprofitant aquesta característica, utilitzem els enzims de restricció per dur a terme digestions control del DNA d'interès, i per altra banda, per dur a terme la clonació clàssica.

Per realitzar una digestió del DNA per enzims de restricció s'utilitza de 1 a 10 U/ μg de DNA, sense superar el 10% del volum final de la reacció, ja que una concentració superior al 5% inhibeix l'activitat enzimàtica. En general, les digestions es duen a terme a 37°C entre 1 i 16 hores, depenent de l'eficiència de la reacció de digestió i de la quantitat de DNA.

Per realitzar una clonació clàssica, es digereix 10 μg de DNA i la reacció es deixa tota la nit (16 hores).

1.5 CLONATGE DE DNA PLASMÍDIC.

En aquesta Tesi s'ha utilitzat dues tècniques de clonatge per inserir el gen d'interès en diferents vectors d'expressió, o per obtenir diferents proteïnes de fusió. Les dues tècniques de clonació utilitzades són: la clonació clàssica mitjançant l'ús d'enzims de restriccions i la clonació per recombinació mitjançant el sistema *Gateway* (Invitrogen).

1.5.1 Clonació clàssica.

La clonació per lligació és el mètode clàssic per construir vectors. Aquesta tècnica es basa en digerir el vector i l'insert (el gen d'interès) amb enzims de restricció que generin

extrems compatibles per ser fusionats sens alterar la pauta de lectura de l'insert. Un cop digerits, es procedeix a la lligació utilitzant la DNA lligasa, la qual forma un enllaç fosfodièster entre els extrems 5-fosfat i 3-hidroxil de nucleòtids adjacents, permetent la fusió entre el vector i l'insert. Per evitar que la lligasa torni a fusionar els extrems del vector, prèviament es realitza un tractament amb fosfatasa alcalina, la qual elimina els grups 5'-fosfat dels extrems del DNA. D'aquesta manera, només els extrems de l'insert contenen el grup 5'- fosfat necessaris per la lligació.

MATERIAL

- Vector de clonació digerit, purificat i tractat amb fosfatasa alcalina.
- Insert digerit i purificat.
- Fosfatasa alcalina (*New England Biolabs*).
- T4-DNA lligasa (*New England Biolabs*).

PROTOCOL

Amb el vector:

1. Digerir 10 µg del vector, amb els corresponents enzims de restricció i deixar a 37°C tota la nit (16 hores). Volum final de la reacció 50 µL.
2. Realitzar una electroforesis en gel d'agarosa de la reacció anterior per verificar la digestió i la integritat del vector. Utilitzar 2 µL de la reacció.
3. Tractament amb fosfatasa alcalina. Afegir 2 µL de fosfatasa alcalina i incubar a 37°C durant 2 - 3 hores.
4. Realitzar una electroforesis en gel d'agarosa de tot el volum, i purificar el fragment (apartats 1.2 i 1.3).
5. Quantificar la concentració del DNA en el nanodrop.

Amb l'insert:

1. Amplificar l'insert mitjançant una PCR (apartat 1.1).

2. Digerir, amb els corresponents enzims de restricció, tot el volum procedent de la PCR. Deixar digerint tota la nit (16 hores).
3. Realitzar una electroforesis en gel d'agarosa de tot el volum, i purificar el fragment (apartats 1.2 i 1.3).

Lligació

El procés de lligació consisteix en unir l'insert d'interès en un vector. La reacció és catalitzada per l'enzim T4 DNA-ligasa, el qual forma un enllaç fosfodièster entre l'extrem 5' fosfat i el 3' hidroxil en un DNA de doble cadena.

L'èxit d'una lligació depèn de varis factors que s'han de tenir en compte: la qualitat i la quantitat de DNA utilitzat, la relació molar entre el vector i l'insert, el grau de fosforilació del vector, el mètode de transformació i la forma dels extrems que han generat els enzims de restricció. Els extrems cohesius són millors que els roms, ja que si es generen dos extrems roms l'insert es pot inserir en totes dues direccions. Per aquest motiu, és millor dos extrems cohesius o un extrem cohesiu i un rom.

Per establir la relació insert:vector utilitzem la fórmula:

$$\frac{50ng \text{ vector } \times \text{ mida insert (kb)}}{\text{mida vector (kb)}} \times \frac{6}{1} = ng \text{ insert}$$

Per validar que la lligació ha anat correctament, s'han de 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 funcioni bé.
- **Control negatiu de transformació:** plaquejar bacteris no transformats.

La lligació haurà funcionat correctament quan observem moltes més colònies en la lligació problema que en el control negatiu de lligació, i cap colònia en el control negatiu de transformació.

PROTOCOL

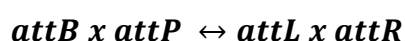
1. Digerir 50 µL del vector amb els enzims de restricció seleccionats.
2. Afegir 2 µL de fosfatasa alcalina en els 50 µL del vector digerit i incubar 30 minuts a 37°C.
3. Realitzar una electroforesi i una purificació del vector digerit i de l'insert (apartats 1.2 i 1.3).
4. En un tub *ependorf* de 1,5 mL preparar la següent reacció de lligació i deixar-la tota la nit a 18°C.

- Insert de DNA	6 µL
- Vector	2 µL
- T4 DNA-ligasa	1 µL
- Tampó de la lligasa 10X	1 µL
Volum final	10 µL

5. Transformar en bacteris, extreure i comprovar per digestió i seqüenciació el DNA.

1.5.2 Clonació per recombinació mitjançant el sistema *gateway* (invitrogen).

El sistema *Gateway* d'invitrogen és un mètode de clonatge basat en la recombinació de lloc específic del *fag lambda*. Aquest sistema permet la transferència d'un insert d'un vector a un altre utilitzant un vector d'entrada (*Entry clone*) que es capaç de recombinar amb una àmplia gamma de vectors destí de diferents sistemes d'expressió (bacteriana, mamífers, lentivirals, adenovirals, etc...). La base d'aquesta tècnica recau en la recombinació específica i bidireccional de les seqüències:



En el **sistema Gateway** mitjançant la clonació per recombinació (reacció BP), integrem el nostre insert en un plàsmid d'entrada (*Entry clone*). L'*Entry clone* ens permet fàcilment la integració de l'insert a tota una bateria de vectors d'expressió a través de la reacció LR. A més, el sistema ofereix la possibilitat de fusionar altres seqüències (epítops, proteïnes fluorescents, etc.) en l'extrem N o C-terminal del nostre insert (*Multisite Gateway*). Les avantatges principals del sistema *Gateway* respecte al mètode clàssic de lligació són:

- a) Estalvi de temps, ja que no es requereix dissenyar ni realitzar la digestió per restricció, i les reaccions de recombinació són més ràpides.
- b) Versatilitat: intercanvi senzill dels inserts entre vectors sense la necessitat de tornar a seqüenciar després de la reacció de recombinació.
- c) Rendiment: les reaccions són més eficients.

Un cop obtingut l'*entry clone*, podem clonar l'insert a qualsevol vector destí (**pDEST**). Aquest vector conté: el gen resistent a ampicil·lina, el gen *ccdB* i les seqüències de recombinació *attR1* i *attR2*. A través de la **reacció LR**, recombinem el *pENTR* i el *pDEST*, obtenim el vector d'expressió desitjat que presenta: el gen d'interès (flanquejat per les seqüències *attB1* i *attB2*), la resistència a ampicil·lina i ha eliminat el gen *ccdB*.

1.5.2.1 Disseny dels oligonucleòtids pel sistema *gateway*.

Mitjançant una PCR, introduïm les seqüències de recombinació *attB1*, *attB2*, *attB5* o *attB5R* en el nostre insert. Depenen de l'objectiu de la clonació, flanquejarem el nostre insert amb diferents combinacions de seqüències *attB*:

- Introduir el nostre insert en el vector d'expressió (*Gateway* senzilla). Flanquejarem el nostre insert amb *attB1* (5') i *attB2* (3').
- Introduir el nostre insert fusionat a una seqüència o epítop (flag, GFP, etc.) (*Multisite Gateway*):

a) Fusionar epítop a l'extrem C-terminal del nostre insert. Flanquejar:

Insert amb attB1 (5') i attB5R (3').

Epítop amb attB5 (5') i attB2 (3').

b) Fusionar epítop en l'extrem N-terminal del nostre insert. Flanquejar:

Insert amb attB5 (5') i attB2 (3').

Epítop amb attB5 (5') i attB2 (3').

El disseny dels oligonucleòtids està format per la seqüència attB seguida de 18-25 nucleòtids del nostre insert. D'aquesta manera, els oligonucleòtids presenten una cua attB que no hibridarà en la PCR, i una regió d'hibridació de 18-25 nucleòtids.

attB1 (*forward*): 5' - GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAACC - (gen) - 3'

kozak

attB5 (*forward*): 5' - GGGGACAACCTTTGTATACAAAAGTTGTG - (gen) - 3'

attB5r (*reverse*): 5' - GGGGACAACCTTTGTATACAAAAGTTGT - (gen) - 3'

attB2 (*reverse*): 5' - GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTA - (gen) - 3'

stop

Nota:

1. Afegim quatre guanines (G) a l'extrem 5' per augmentar l'eficiència de la recombinasa.
2. Introduir la seqüència kozak (ACC, iniciadora de l'inici de traducció) únicament al inici de la regió que volem traduir. Per tant, en l'oligonucleòtid que introdueix la seqüència attB1, se li afegeix la seqüència *kozak* (ACC), que incorporem abans del codó d'inici del gen (ATG) per facilitar el reconeixement de la seqüència d'iniciació (AUG) durant el procés de traducció.

3. Introduir el codó stop únicament al final de la regió que volem traduir. En l'oligonucleòtid que introdueix la seqüència attB2 se li afegeix un codó d'aturada (*codó stop*) de la traducció del gen d'interès.

1.5.2.2 Construcció *entry clone*. reacció BP (attb x attp).

Per dur a terme la reacció BP, en primer lloc, hem de flanquejar la seqüència de DNA d'interès amb les seqüències attBs. Per fer-ho, hem de realitzar una PCR utilitzant els oligonucleòtids específics que prèviament hem dissenyat, i purificar el fragment després de separar-lo mitjançant una electroforesi en gel d'agarosa (apartats 1.1 i 1.2). Un cop generat l'insert de DNA flanquejat pels attBs, realitzem la **reacció de recombinació BP** que consisteix en la recombinació específica de les seqüències attB1 x attP1, attB2 x attP2, attB5 x attP5 i attB5R x attP5R. Les seqüències attP estan en el plàsmid pDONOR221 flanquejant un gen de selecció negativa ccdB (interfereix amb la DNA girasa de *E. coli* inhibint el creixement de la majoria de soques *E. coli*) i un gen de resistència a cloranfenicol (Cf^R) (utilitzat per la selecció durant l'amplificació dels vector *gateway*). A més, els pDONOR221 presenten resistència a la kanamicina (Kan^R). En el laboratori disposem de tres versions dels plàsmids pDONOR221: pDONOR221 P1P2, P1P5R i P5P2. Per tant, en funció de les seqüències attB introduïdes en el insert quan realitzem la reacció BP, escollirem el pDONOR221 compatible. Com a resultat de la reacció BP, obtenim el nostre insert en l'*entry clone* flanquejat per les seqüències attL i, un residu de la reacció que són el gen ccdB i Cf^R flanquejats per les seqüències attR (**figura 29**). L'*entry clone* manté el gen de resistència a kanamicina el qual permetrà la seva selecció.

PROTOCOL

1. Amplificar l'insert d'interès mitjançant una PCR amb els oligonucleòtids 5' (attB1 o attB2) i 3' (attB2 o attB5R).
2. Realitzar una electroforesi en gel d'agarosa i purificar l'insert d'interès (apartat 1.2 i 1.3).

3. Reacció BP:

Producte de PCR - attB (20-50 fmols)	3 µL
pDONOR (150 ng/µL)	1 µL
BP clonasa II	1 µL

4. Incubar la reacció a 25°C entre 2 - 12 hores.

5. Aturar la reacció afegint 1 µL de proteïnasa k, i incubar a 37°C durant 10 minuts.

Tot seguit, la barreja estarà llesta per ser transformada i sembrada en placa de kanamicina (apartat 1.6). Finalment, per obtenir l'*entry clone* hem de: picar colònies aïllades i créixer-les en medi LB selectiu (apartat 1.8), extreure el DNA (apartat 1.8), quantificar-lo en el nanodrop (apartat 1.9), realitzar una digestió control (apartat 1.4) i seqüenciar completament l'insert per descartar qualsevol error que s'hagi produït durant la PCR (apartat 1.10).



Figura 29. Esquema de la recombinació BP. Modificat del protocol "ThermoFisher – Gateway Technology with Clonase".

1.5.2.3 Construcció vector destí. Reacció LR (attL x attR).

Un cop obtinguts els nostres *Entry clones*, realitzarem la reacció LR per introduir les seqüències d'interès en el vector destí. La reacció LR recombinarà les seqüències attL (o attR5) que estan flanquejant el nostre insert (i seqüència de fusió) amb les seqüències attR1 i attR2 que flanquegen el gen de letalitat ccdB i Cf^R en el vector destí. El resultat final de la reacció LR serà el nostre vector d'expressió resistent a l'ampicilina (**figura 30**). Depenent de si només volem tenir el nostre insert sol, o bé, fusionat amb una seqüència d'interès, realitzarem la reacció LR senzilla o la reacció LR de *Multisite Gateway*.

a) REACCIÓ LR SENZILLA:

Recombinació de l'*Entry clone* de l'insert amb el vector destí (figura 30).

PROTOCOL

1. En un tub *ependorf* de 1,5 mL afegir els següents volums:

<i>Entry clone</i>	150 ng (1 - 3 μ L)
Vector destí	150 ng (1 - 3 μ L)
LR <i>clonase II</i>	1 μ L
Aigua milli-Q	X μ L
Volum final	5 μ L

2. Incubar la reacció a 25°C entre 2 - 12 hores.

3. Aturar la reacció afegint 1 μ L de proteïnasa k i incubant a 37°C durant 10 minuts.

Tot seguit, la barreja estarà llesta per ser transformada i sembrada en placa d'ampicil·lina (apartat 1.6). Finalment, per obtenir l'*entry clone* hem de: picar colònies aïllades i créixer-les en medi LB selectiu (apartat 1.8), extreure el DNA (apartat 1.8), quantificar-lo en el nanodrop (apartat 1.9), realitzar una digestió control (apartat 1.4) i seqüenciar completament l'insert (apartat 1.10).



Figura 30. Esquema de la recombinaió LR senzilla. Modificat del protocol "ThermoFisher – Gateway Technology with Clonase II".

b) REACCIÓ LR de MULTISITE GATEWAY:

El sistema *Gateway multisite* permet construir fàcilment vectors d'expressió a partir de 2, 3 o 4 fragments de DNA. Aquesta tecnologia utilitza la recombinaió específica de lloc per clonar simultàniament varis fragments de DNA en la ordenació i orientació correcte

depenent de les seqüències att que els flanquegen. En aquesta Tesi, hem utilitzat el sistema *Gateway multisite* per clonar 2 fragments de DNA en un mateix vector destí. En primer lloc, s'introdueix per PCR les seqüències attB1 i attB5r en un fragment, i en l'altre s'introdueixen les seqüències attB5 i attB2. Cada fragment de DNA es clona en el seu vector donador pDONOR221 P1-P5r i pDONOR221 P5-P2, respectivament, obtenint dos *Entry clones*. Finalment, els dos *Entry clones* es recombinen en el mateix vector d'expressió mitjançant l'enzim **LR clonasa II plus** (figura 31).

PROTOCOL

1. En un tub *ependorf* de 1,5 mL afegir els següents volums:

- *Entry clone 1* 10 fmols
- *Entry clone 2* 10 fmols
- Vector destí 20 fmols
- LR clonasa II plus 1 µL
- Aigua milli-Q X µL
- Volum final 5 µL

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

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

x: número de fmols

N: mida del DNA en pb

2. Incubar la reacció a 25°C entre 2 - 12 hores.

3. Aturar la reacció afegint 1 µL de proteïnasa k i incubant a 37°C durant 10 minuts.

Tot seguit, la barreja estarà llesta per ser transformada i sembrada en placa d'ampicil·lina (apartat 1.6). Finalment, per obtenir l'*entry clone* hem de: picar colònies aïllades i créixer-les en medi LB selectiu (apartat 1.8), extreure el DNA (apartat 1.8), quantificar-lo en el nanodrop (apartat 1.8), realitzar una digestió control (apartat 1.4) i seqüenciar completament l'insert (apartat 1.10).

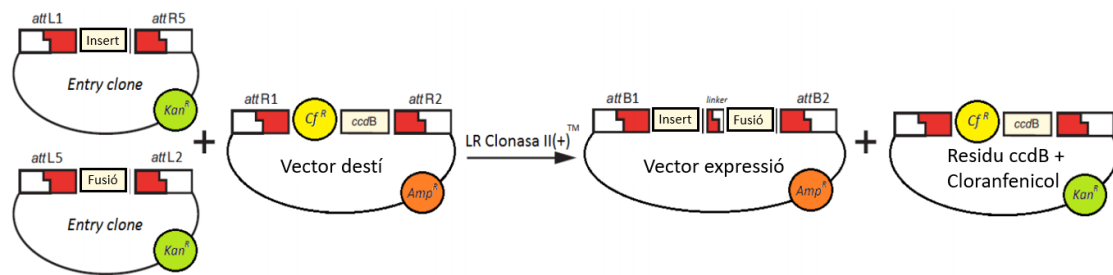


Figura 31. Esquema de la recombinaçió LR Multisite. Modificat del protocol “ThermoFisher – Gateway Technology with Clonase II+”.

1.5.2.4 Generació de plàsmids T2A.

La tècnica es basa en inserir la seqüència *2A self-cleaving peptide* (també nomenada T2A) entre les seqüències de les proteïnes que es volen expressar. La seqüència T2A regula l'expressió simultània i l'escissió dels diferents gens d'interès. Per tant, la seqüència T2A serà tallada pels ribosomes de la cèl·lula, permetent l'expressió de les proteïnes que estiguin dins del marc obert de lectura i fusionades amb aquest pèptid. D'aquesta manera, dins la cèl·lula s'obté una expressió de les proteïnes amb la mateixa estequiometria, ja que estan controlades per només un promotor.

Aquesta metodologia ens permet expressar dues proteïnes en la mateixa cèl·lula i amb les mateixes quantitats. En el nostre cas, utilitzem el sistema T2A per coexpressar a la mateixa cèl·lula la proteïna GlialCAM WT i diferents mutants de GlialCAM per poder estudiar els efectes dels mutants sobre la proteïna WT en la mateixa cèl·lula, mantenint la estequiometria WT/mutant (**figura 32**).

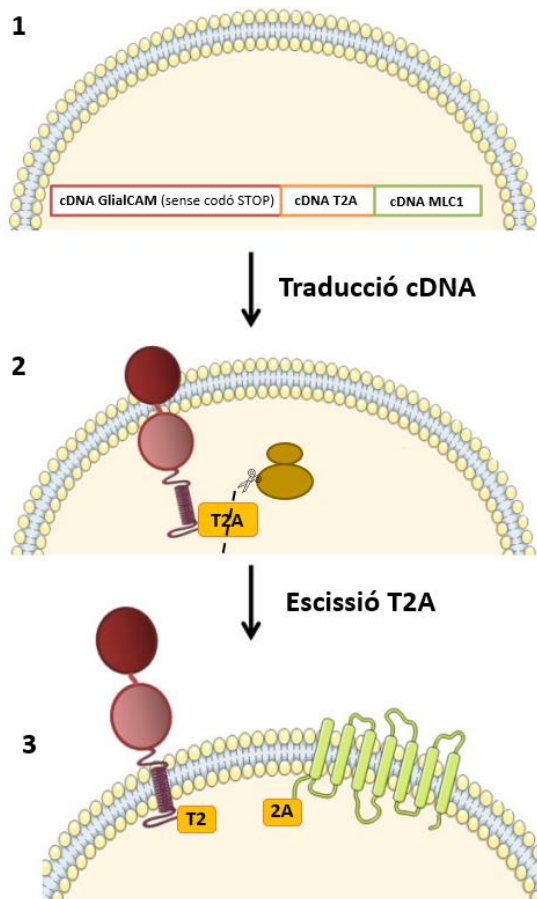


Figura 32. Representació esquemàtica del procés cel·lular dels constructes amb T2A. 1 i 2) El cDNA és transcrit a mRNA i després traduït a proteïna. Durant la traducció el pèptid T2A és tallat (2). La traducció continua amb la síntesi de la segona molècula. 3) Les dues proteïnes s'expressen independentment en la mateixa cèl·lula amb la mateixa estequiometria.

La seqüència del pèptid T2A utilitzada és la següent, senyalitzant per on es produeix el tall:

Gly	Ser	Gly	Glu	Gly	Arg	Gly	Ser	Leu	Leu	Thr	Cys	Gly	Asp	Val	Glu	Glu	Asn	Pro	Gly
GGCAGTGGAG	AGGGCAGAGG	AAGTCTGCTA	ACATGCGGTG	ACGTCGAGGA	GAATCCTGGC	CCGTCACCTC	TCCCGTCTCC	TTCAGACGAT	TGTACGCCAC	TGCAGCTCCT	CTTAGGACCG								

1.6 OBTENCIÓ DE BACTERIS ELECTROCOMPETENTS.

L'amplificació del DNA es necessària per tal de tenir suficient quantitat i poder dur a terme els diferents experiments. Partim d'un DNA plasmídic que conté el nostre insert d'interès i és resistent a un antibiòtic. Aquest DNA té capacitat autoreplicativa en cèl·lules bacterianes, per aquest motiu, a través de xoc elèctric, introduïm el DNA recombinant dins els bacteris electrocompetents. Aquest procés rep el nom de **transformació**. Després de transformar els bacteris, es fan créixer en plaques de LB-agar que contenen l'antibiòtic que només presenten resistència els bacteris que han

incorporat el DNA exogen. Els bacteris que s'han utilitzat en aquesta Tesi són les soques DH5 α de *Escherichia coli*.

MATERIALS

- Bacteris *E. coli* de la soca DH5 α .
- Medi LB.
- Glicerol al 10% (v/v) en aigua i autoclavat. Mantenir a 4°C.
- Tubs de centrifuga de 500 mL autoclavats. Mantenir a 4°C.

PROTOCOL

Tot el procediment es realitza en una campana de flux laminar o sota una flama *bunsen* per evitar contaminacions.

1. Raspar el glicerol de bacteris DH5 α i inocular en 5 mL de LB sense antibiòtic de selecció. Incubar a 37°C en agitació (240 rpm) durant 12-16 hores.
2. Diluir el precultiu 1:100 (v/v) en 500 mL de LB i incubar a 37°C en agitació (240 rpm) fins arribar a una DO₆₀₀ de 0,5-0,7, els bacteris es troben en fase logarítmica creixent.
3. Aturar el creixement bacterià incubant el cultiu en gel durant 20 minuts.
4. Transferir els bacteris als tubs de centrifuga de 500 mL, prèviament refredats a 4°C, i centrifugar a 4.000 x *g* durant 15 minuts a 4°C.
5. Eliminar el sobrenedant per decantació i resuspendre el pèl·let en 500 mL de glicerol 10%, prèviament refredat a 4°C. Centrifugar l'homogenat a 4.000 x *g* durant 15 minuts a 4°C.
6. Repetir el pas 5 dues vegades, resuspenent el pèl·let en 250 mL de glicerol 10%.
7. Resuspendre el pèl·let en 2 mL de glicerol 10%.
8. Fer alíquotes de 50 μ L i congelar-les ràpidament amb nitrogen líquid. Guardar-les a -80°C.

1.7 TRANSFORMACIÓ DE BACTERIS PEL MÈTODE D'ELECTROPORACIÓ.

Per dur a terme la transformació, utilitzem el mètode d'electroporació que es basa en aplicar una descarrega elèctrica als bacteris que permeabilitza la seva paret cel·lular produint porus i permetent l'entrada de DNA exogen.

MATERIALS

- Bacteris *E. coli* de la soca DH5 α .
- Medi LB.
- Cubeta d'electroporació de 0,1 cm (Biorad).
- Electroporador (Biorad Micropulser).
- Plaques de Petri amb medi LB-agar que continguin l'antibiòtic de selecció del plàsmid.

PROTOCOL

1. Afegir 0,5 μ L del DNA a transformar en una alíquota de 50 μ L dels bacteris electrocompetents. Mantenir l'alíquota de bacteris en gel.
2. Homogeneïtzar la mostra i transferir-la entre els dos elèctrodes d'una cubeta d'electroporació, prèviament refredada.
3. Aplicar descarrega elèctrica de 375 V amb l'electroporador seleccionant el programa per bacteris (*Ec 1*). L'aparell ens dona el temps que la mostra ha estat sotmesa al xoc elèctric (*time constant*). Quan més elevat hagi sigut el temps empleat major quantitat de porus oberts hauran a la paret cel·lular, permetent l'entrada del DNA exogen. Per tant, es indicatiu de l'eficiència de transformació.
4. Recuperar la mostra afegint 250 μ L de LB sense antibiòtic entre els dos elèctrodes de la cubeta d'electroporació, i transferir-la en un falcon de 15 mL.
5. Incubar la mostra a 37°C en agitació (240 rpm) durant 1 hora.
6. Sembrar els bacteris transformats en una placa de Petri que contingui LB-agar i l'antibiòtic de selecció. El volum de bacteris a sembrar dependrà de l'experiment que

provingui el plàsmid. Per una amplificació sembrem 5 µL, però si prové d'una BP o LR sembrem entre 150-200 µL.

7. Incubar la placa de Petri, en posició invertida, a 37°C durant 12-16 hores.

1.8 OBTENCIÓ I PURIFICACIÓ DEL DNA PLASMÍDIC.

Per extreure el DNA amplificat a partir de la transformació de bacteris, utilitzem els equips comercials de Qiagen (*Qiagen Plasmid Kit*). Hi ha diferents variants del kit segons del volum de cultiu que partim. En el cas de les **minipreparacions**, partim d'un volum de cultiu de 5 mL i obtenim una quantitat de DNA entre 0,3 - 0,6 µg/µL en un volum final de 50 µL; en les **midipreparacions** partim d'un volum de cultiu de 50 mL i obtenim una quantitat de DNA entre 1-2 µg/µl en un volum final de 100 µL; i en les **maxipreparacions** partim d'un volum de cultiu de 250 mL i obtenim una quantitat de DNA entre 1-2 µg/µl en un volum final de 200 µL.

Aquests equips es basen en el mateix principi d'aïllament, la lisi alcalina dels bacteris i posteriorment l'unió del DNA amb una resina d'intercanvi iònic. Durant el procés, s'eliminen les impureses (RNA, DNA cromosòmic, proteïnes, etc...) amb una sèrie de rentats de la resina utilitzant solucions de salinitat mitja amb etanol.

1.8.1 Minipreparacions.

Utilitzem l'equip comercial *Qiagen Plasmid Kit* (Qiagen)

MATERIAL

- 5 mL de pre-cultiu crescut en medi LB amb antibiòtic de selecció.
- L'equip comercial *Qiagen Plasmid Kit* (Qiagen) conté:
 - P1: Tampó de resuspensió (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM EDTA; 100 µg/mL RNase A, opcionalment LyseBlue 1X).
 - P2: Tampó de lisi (200 mM NaOH, SDS 1%).
 - S3: tampó de neutralització (2,55 M acetat de potassi pH 4,8).

- Columnes d'intercanvi iònic
- Tampó de rentat (200 mM NaOH; 20 mM Tris-HCl pH 7,5; 5 mM EDTA; barrejada 1:1 amb EtOH absolut).
- Aigua Milli-Q o tampó TE

PROTOCOL

1. Centrifugar els 5 mL de pre-cultiu a $5.400 \times g$ durant 10 minuts a temperatura ambient.
2. Resuspendre el pèl·let en 250 μL de tampó de resuspensió.
3. Afegir 250 μL de tampó de lisi i barrejar per inversió fins que la solució es torna blava.
4. Afegir 350 μL de tampó de neutralització i barrejar fins que la solució es torna blanca.
5. Centrifugar l'homogenat a $17.900 \times g$ durant 10 minuts a temperatura ambient.
6. Transferir el sobrenedant a un tub acoblat a una columna amb resina d'intercanvi iònic i deixar incubant 1 minut a temperatura ambient.
7. Centrifugar la columna a $17.900 \times g$ durant 1 minut a temperatura ambient. El DNA queda unit a la resina i el sobrenedant queda dipositat en el fos del tub. Descartar el sobrenedant i tornar a acoblar la columna al tub.
8. Afegir 750 μL de la solució rentat (amb EtOH) i centrifugar la columna a $17.900 \times g$ durant 1 minut a temperatura ambient. Descartar el sobrenedant i tornar a acoblar la columna al tub.
9. Centrifugar a $17.900 \times g$ durant 1 minut a temperatura ambient per eliminar les restes d'etanol que poden quedar i degradar el DNA.
10. Acoblar la columna en un tub *ependorf* nou de 1,5 mL i incubar el DNA amb 50 μL d'aigua Milli-Q o el tampó TE durant 1 minut a temperatura ambient.
11. Eluir el DNA centrifugant a $17.900 \times g$ durant 1 minut a temperatura ambient.
12. Quantificar la concentració del DNA i guardar-lo a -20°C .

1.8.2 Midipreparacions.

Utilitzem l'equip comercial *Qiagen Plasmid Midi Kit* (Qiagen)

MATERIAL

- 50 mL de pre-cultiu crescut en medi LB amb antibiòtic de selecció.
- L'equip comercial *Qiagen Plasmid Midi Kit* (Qiagen) conté:
 - P1: tampó de resuspensió (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM EDTA; 100 µg/mL RNase A; opcionalment LyseBlue 1X).
 - P2: tampó de lisi (200 mM NaOH; SDS 1%).
 - S3: tampó de neutralització (2,55 M acetat de potassi pH 4,8).
 - Filtre QIAfilter cartridge, èmbol i tube extender
 - BB: tampó de captura.
 - Columnes d'intercanvi iònic.
 - ETR: tampó de rentat.
 - PE: tampó de rentat (200 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 5 mM EDTA; afegir l'etanol que indica el recipient).
 - EB: tampó d'elució
- Aigua Milli-Q o tampó EB

PROTOCOL

1. Centrifugar els 50 mL de precultiu a 5.400 x g durant 20 minuts a temperatura ambient i aspirar el sobrenedant amb el buit.
2. Resuspendre el pèl·let amb 4 mL de tampó P1.
3. Afegir 4 mL de tampó P2 i barrejar per inversió (si s'ha afegit LyseBlue en el tampó P1, l'homogenat es tornarà de color blau). Incubar 3 minuts a temperatura ambient.
4. Afegir 4 mL de tampó S3 i barrejar per inversió fins que la solució es torna de color blanc.
5. Acoblar el filtre QIAfilter Cantridge a un falcón de 50 mL i transferir el lisat al filtre. Deixar incubar 10 minuts a temperatura ambient.

6. Introduir l'èmbol en el filtre i pressionar cap a la part inferior. El lisat es filtrarà i es recollirà en el falcon de 50 mL.
7. Afegir 2 mL de tampó BB i barrejar 5-6 vegades per inversió.
8. Acoblar *tube extender* a la part superior de la columna i transferir el llisat a la columna a través del *tube extender*.
9. Aplicar el buit per la part inferior de la columna fins que passi tot el volum.
10. Afegir 700 µL de tampó ETR i aplicar el buit fins que passi tot el volum.
11. Afegir 700 µL de tampó PE i aplicar el buit fins que passi tot el volum.
12. Centrifugar a 17.900 x *g* durant 1 minut a temperatura ambient per eliminar les restes de tampons anteriors que hagin pogut quedar.
13. Acoblar la columna a un tub *ependorf* nou de 1,5 mL i eluir el DNA afegint 200 µL del tampó EB o aigua Milli-Q. Incubar 1 minut a temperatura ambient.
14. Centrifugar a 17.900 x *g* durant 1 minut a temperatura ambient.
15. Quantificar la concentració del DNA i guardar-lo a -20°C.

1.8.3 Maxipreparacions.

Utilitzem l'equip comercial *Qiagen Plasmid Maxi Kit* (Qiagen)

MATERIAL

- 250-500 mL de pre-cultiu crescut en medi LB amb antibiòtic de selecció.
- L'equip comercial *Qiagen Plasmid Maxi Kit* (Qiagen) conté:
 - P1: tampó de resuspensió (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM EDTA; 100 µg/mL RNase A; opcionalment LyseBlue 1X).
 - P2: tampó de lisi (200 mM NaOH; SDS 1%).
 - S3: tampó de neutralització (2,55 M acetat de potassi pH 4,8).
 - QIAGEN-tip 500.
 - QBT: tampó d'equilibrar.

- QC: tampó de rentat.
- QF: tampó d'elució
- Etanol 70%
- Aigua Milli-Q

PROTOCOL

1. Centrifugar els 250-500 mL de precultiu a 6.000 x g durant 15 minuts a temperatura ambient i aspirar el sobrenedant amb el buit.
2. Resuspènere el pèl·let amb 10 mL de tampó P1.
3. Afegir 10 mL de tampó P2 i barrejar per inversió (si s'ha afegit *LyseBlue* en el tampó P1, l'homogenat es tornarà de color blau). Incubar 5 minuts a temperatura ambient.
4. Afegir 10 mL de tampó S3, barrejar per inversió fins que la solució es torna de color blanc i incubar 15 minuts.
5. Centrifugar a 20.000 x g durant 30 minuts a 4°C i descartem el pèl·let.
6. Centrifugar el sobrenedant a 20.000 x g durant 15 minuts a 4°C.

Nota: els passos 5 i 6 es poden substituir filtrant la mostra amb els QIAfilter Kits or Cartridges.

7. Equilibrar QIAGEN-tip 500 amb 100 mL de tampó QBT. Deixar que vagi caient per gravetat.
8. Abocar el sobrenedant al QIAGEN-tip i deixar que vagi caient per gravetat.
9. Rentar dues vegades el QIAGEN-tip amb 30 mL del tampó QC.
10. Eluir el DNA amb 15 mL de tampó QF.
11. Precipitar el DNA afegint 10,5 mL d'isopropanol a temperatura ambient. Immediatament, barrejar i centrifugar a 15.000 x g durant 30 minuts a 4°C. Aspirar el sobrenedant amb compte de no efecter el pèl·let.
12. Rentar el pèl·let del DNA amb 5 mL d'etanol al 70% a temperatura ambient.

13. Centrifugar a 15.000 x g durant 10 minuts i eliminar el sobrenedant sense aspirar el pèl·let.
14. Assecar a l'aire el pèl·let durant 5-10 minuts per eliminar les restes d'etanol i resuspendre el pèl·let en aigua.
15. Quantificar la concentració del DNA i guardar-lo a -20°C.

1.9 QUANTIFICACIÓ DEL DNA.

Els àcids nucleics presenten un pic d'absorbància a una densitat òptica de 260 nm, fet que permet quantificar i validar la seva puresa. El DNA extret el quantifiquem utilitzant un espectrofotòmetre (*Nanodrop*) a una densitat òptica de 260 nm, punt que s'utilitza per extrapolar la concentració de la mostra que correspon a 50 µg/mL de DNA i la concentració en µg/µL.

La fórmula a aplicar és la següent: $C = \text{Abs}_{260} \times 50 \mu\text{g} / 1000 \mu\text{L} \times \text{FD}$

C: concentració; Abs: absorbància; FD: factor de dilució

PROTOCOL

1. Calibrar el *Nanodrop* (blanc), utilitzant 1-2 µL del tampó on hi ha la mostra.
2. Pipetejar 1-2 µL de mostra a l'espectrofotòmetre que et donarà la concentració en µg/µL.

1.10 SEQÜENCIACIÓ DEL DNA.

Seqüenciar el DNA és l'últim pas per verificar que el constructe d'interès no té cap errada en la seva seqüència de nucleòtids. En el laboratori, utilitzem el sistema comercial basat en el mètode de Sanger, concretament el sistema *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*.

El procediment consisteix en amplificar el DNA per PCR utilitzant desoxiribonucleòtids (dNTPs) fluorescents. Aquests dNTPs fluorescents no presenten l'extrem 3' OH,

provocant una finalització temprana de la polimerització de la cadena del DNA, ja que s'impedeix la formació de l'enllaç fosfodièster. Els productes de la PCR es passen per una columna d'electroforesi capil·lar que separa els diferents fragments amplificats del DNA per mida. L'electroforesi s'acobla a un aparell de fluorescència, permetent obtenir un cromatograma amb els pics d'emissió de cada nucleòtid.

PROTOCOL

1. Afegir en un tub de 0,5 mL:
 - a) 150 - 600 ng de DNA.
 - b) 3,2 µL del oligonucleòtid a 1 µM (encebador).
2. Assecar els tubs utilitzant el termociclador programat 20 minuts a 80°C.
Nota: posar els tubs sense tap perquè s'evapori el líquid que contenen.
3. Enviar les mostres al servei de genòmica dels centres científics i tecnològics de la Universitat de Barcelona on realitzen la seqüenciació.

2. TÈCNiques DE BIOLOGIA DE PROTEÏNES.

2.1 OBTENCIÓ DE PROTEÏNA TOTAL

Per estudiar les proteïnes transfectades en línies cel·lulars hem de realitzar la seva extracció i quantificació utilitzant el BCA kit.

2.1.1 Obtenció de proteïna total a partir de línies cel·lulars adherents HeLa i HEK.

MATERIAL

- Cultiu cel·lular sembrat en plaques de cultiu.
- PBS 1X
- Tampó de lisi: PBS 1X; 1% tritó X-100; 150 mM NaCl; inhibidors de proteases (leupeptin i pepstatin a 2 µM; PMSF i aprotinin a 1 µM).

- Raspador cel·lular.
- Tubs *ependorfs* de 1,5 mL

PROTOCOL

1. Rentar dues vegades els cultius cel·lulars amb PBS 1X.

A partir d'aquí, tots els passos es realitzaran a 4°C per evitar que la proteïna es degradi.

2. Afegir tampó de lisi (0,8-1 mL per plaques de 10 mm, 80-100 µL per plaques de 6 pous).
3. Raspar les cèl·lules amb el raspador cel·lular, i resuspendre el lisat cel·lular i transferir-lo a un tub *ependorf* de 1,5 mL.
4. Incubar el lisat cel·lular durant 1 hora en agitació a 4°C.
5. Centrifugar el lisat cel·lular a 15.800 x *g* durant 10 minuts a 4°C. Recuperar el sobrenedant en un tub *ependorf* de 1,5 mL, ja que és on estan les proteïnes solubles.

2.1.2 Obtenció de proteïna total de membrana a partir de línies cel·lulars en suspensió HEK

MATERIAL

- Cultiu cel·lular
- PBS 1X
- Tampó de lisi: 10 mM Tris pH 8; 10 mM NaCl; inhibidors de proteases (*kit complete mini EDTA-FREE*; Roche)
- Tampó de solubilització sense detergent: 100 mM Tris pH 8; 150 mM NaCl; 10% glicerol; inhibidors de proteases (*kit complete mini EDTA-FREE*; Roche)

PROTOCOL

1. Contar les cèl·lules utilitzant un comptador cel·lular per saber la concentració i la viabilitat cel·lular.
2. Centrifugar el cultiu cel·lular a 500 x *g* durant 10 minuts a 4°C, i descartar el sobrenedant.
3. Resuspendre el pèl·let amb PBS 1X fred, centrifugar les cèl·lules a 500 x *g* durant 10 minuts a 4°C, i descartar el sobrenedant.
4. Repetir el pas anterior per eliminar totes les restes de medi en les cèl·lules.

Nota: si t'interessa tenir la proteïna de tota la cèl·lula (proteïna citosòlica i proteïna de membrana) o només la proteïna citosòlica, congelar el pèl·let de cèl·lules en nitrogen líquid i guardar-lo a -80°C.

5. Resuspendre el pèl·let en el tampó de lisi i homogeneïtzar amb l'homogeneïtzador, aproximadament 30 vegades.
6. Centrifugar a 4.000 x *g* durant 15 minuts a 4°C per eliminar les restes cel·lulars (el pèl·let).
7. Ultracentrifugar el sobrenedant a 200.000 x *g* durant 1 hora a 4°C (rotor 50.2Ti a 41.000 rpm o rotor 70.1 Ti a 55.000 rpm), i descartar el sobrenedant.
8. Resuspendre el pèl·let de membranes en el tampó de solubilització sense detergent, i homogeneïtzar les membranes amb l'homogeneïtzador, aproximadament 30 vegades.
9. Quantificar la proteïna total de membrana utilitzant el BCA *protein assay kit* (ThermoFisher Pierce) (apartat 2.1.3).
10. Congelar les membranes en nitrogen líquid i guardar-les a -80°C.

2.1.3 Quantificació de la proteïna total.

La quantificació de la proteïna la realitzem utilitzant l'equip comercial *BCA protein assay kit* (de l'anglès *Bicinchoninic acid Assay*). Aquesta tècnica es basa en la propietat que tenen els enllaços peptídics en solució alcalina de reduir els ions de coure. Els ions de coure s'uneixen a dues molècules de l'àcid bicinconínic produint un canvi en l'estructura electrònica de la molècula, fet que provoca que absorbeixi la llum a 562 nm formant un compost de color lila. Amb l'ajuda d'una recta patró establim la concentració de proteïna present en la mostra. Aquesta metodologia no es compatible amb mostres que continguin més de 100 mM EDTA, 1 mM DTT o 20% de NH_3SO_4 .

MATERIAL

- Placa ELISA de 96 pous.
- Lector ELISA (Biotek).
- *BCA protein assay kit* (Thermofisher Pierce).
- 2 mg/mL BSA.

PROTOCOL

1. En la placa ELISA de 96 pous, carregar per duplicat una recta patró (0; 0,5; 1; 1,5 i 2 μg) amb el BSA del *kit*. Afegir aigua milli-Q fins arribar a 10 μL .
2. Carregar per duplicat 1 μL de la mostra en la placa ELISA de 96 pous i afegir aigua milli-Q fins arribar a 10 μL .

Nota: carregar els μL de mostra necessaris perquè el valor de la teva mostra estigui pel centre de la recta patró. En el cas que estigui en els extrems, el valor obtingut no és fiable, i hauries de repetir el BCA ajustant la quantitat de mostra que poses al pou.

3. Afegir 200 μL del reactiu del BCA a cada pou i incubar 15 minuts a 37°C.
4. Llegir la placa en el lector ELISA (Biotek) a una longitud d'ona de 595 nm.

2.2 FLUORESCÈNCIA D'EXCLUSIÓ PER MIDA (*Fluorescence Size Exclusion Chromatography*, FSEC)

La fluorescència d'exclusió per mida (de l'anglès *fluorescence size exclusion chromatography*, FSEC) és una tècnica que permet analitzar ràpidament diferents condicions detectant el marcatge fluorescent que incorpora la teva proteïna d'interès, normalment utilitzant la proteïna fluorescent GFP.

La tècnica consisteix en solubilitzar o tractar la proteïna d'interès amb les diferents condicions i fer-la passar per una columna d'exclusió per mida. Recollir la mostra amb un col·lector i analitzar per fluorimetria la mostra recollida. Com que la teva proteïna és l'única que incorpora fluorescència, el perfil que obtinguis del fluorímetre correspondrà a la teva proteïna.

MATERIAL

- Extracte cel·lular
- Detergent X%
- Tubs ultracentrífuga de 1,5 mL
- Columna d'exclusió per mida
- Fluorímetre

PROTOCOL

1. Descongela en gel els pèl·lets de l'extracte cel·lular, o en aigua i posar-los en gel ràpidament quan es descongelin.
2. Afegir el detergent a l'extracte cel·lular resuspès en el tampó de solubilització sense detergent (apartat 2.1.2). Solubilitzar 1- 2 hores a 4°C.
3. Centrifugar la mostra a 200.000 x g durant 1 hora a 4°C (Rotor TLA-55 a 55.000 rpm).
4. Passar el sobrenedant a un tub de 1,5 mL nou i injectar la mostra a la columna d'exclusió per mida, prèviament equilibrada (mirar apartat 2.4) i recollir la mostra amb una placa de 96 pous de base negra.

5. Mesurar la mostra per fluorimetria.

2.3 PURIFICACIÓ DE PROTEÏNES.

Per poder fer estudis de funció i/o estructura d'una proteïna es requereix tenir un protocol de purificació. La purificació consisteix en obtenir la proteïna o proteïnes d'interès aïllades sense efectuar la seva conformació fisiològica. Tenir la proteïna aïllada ens permet realitzar estudis de funció o obtenir la seva estructura mitjançant estudis de cristal·lografia o tècniques de crio-microscòpia electrònica (CryoEM).

Tot seguit, explicarem la part del protocol de purificació comuna per les diferents purificacions realitzades a la Tesi, i seguidament, dividirem en diferents apartats el protocol, explicant la purificació de la proteïna MLC1 utilitzant el *tag* de 9 histidines (apartat 2.3.1), la purificació de la proteïna MLC1 utilitzant el *tag* TwinStrep (apartat 2.3.2) i la purificació de la proteïna GlialCAM utilitzant el *tag* 3flag (apartat 2.3.3).

MATERIAL

- Membranes
- Detergent X%
- Tubs ultracentrífuga de 25 mL
- Tampó de rentat: 100 mM Tris pH 8; 150 mM NaCl; detergent 2x CMC

Nota: tots els tampons que estaran en contacte amb la mostra han de portar com a mínim el % de la *critical micelle concentration* (CMC) específic de cada detergent. La concentració de detergent que es posa de manera rutinària és el doble de la CMC (2x CMC). (Chattopadhyay & Harikumar, 1996).

- Aigua MilliQ

PROTOCOL

1. Descongelar en gel els pèl·lets de membranes, o en aigua, i posar-los en gel ràpidament quan es descongelin.

2. Afegir el detergent a les membranes resuspeses en el tampó de solubilització sense detergent (apartat 2.1.2) i, solubilitzar 1-2 hores a 4°C.

Nota: el detergent ha d'estar preparat en el mateix tampó en que es troben resuspeses les membranes per no efecter a les concentracions d'aquest. El temps de solubilització dependrà de cada proteïna.

3. Després de la solubilització, agafar 50 µL de mostra per fer el WB del procés de purificació.
4. Centrifugar la mostra a 200.000 x g durant 1 hora a 4°C. (Rotor 50.2Ti a 41.000 rpm o rotor 70.1Ti a 55.000 rpm).
5. Netejar la resina corresponent amb aigua MilliQ, per eliminar l'etanol que conté el tampó on està resuspesa i, equilibrar-la amb 100 mM Tris-HCl pH 8 i 150 mM NaCl.
6. Després de la ultracentrifuga, agafar 50 µL del sobrenedant, i abocar el sobrenedant a la resina. Incubar la mostra amb la resina a l'orbital 2 hores a 4°C.

A partir d'aquí seguir amb la purificació que correspongui depenent del *tag* que s'estigui utilitzant.

2.3.1 Purificació de la proteïna MLC1 utilitzant el *tag* d'histidines.

MATERIAL

- Resina de níquel (Ni-NTA agarosa, GE Healthcare)
- Imidazol
- Tampó d'elució: 100 mM Tris pH 8; 150 mM NaCl; detergent 2x c.m.c; 250 mM d'imidazol

PROTOCOL que segueix de l'apartat 2.2

7. Abocar la mostra amb la resina en una columna de purificació i recollir el sotanedant.

8. Rentar 3 vegades amb el tampó de rentat afegint 20, 40 i 20 mM d'imidazol, respectivament. Recollir el sotanedant de cada rentat per separat. El volum de cada rentat equival a un volum de columna.

Nota: el volum de columna correspon al volum de resina que s'està utilitzant, si utilitzes 2 mL de resina, un volum de columna són 2 mL.

9. Eluir 6 vegades amb el tampó d'elució. Recollir el sotanedant de cada elució per separat. El volum de cada elució equival a un volum de columna.

Nota: guardar uns μ L del tampó d'elució per fer el blanc al nanodrop.

10. Quantificar en el nanodrop la concentració de proteïna de les 6 elucions, i ajuntar les elucions on hi ha proteïna.

2.3.2 Purificació de la proteïna MLC1 utilitzant el *tag* twinstrep.

MATERIAL

- Resina Strep-Tactin Superflow (IBA Lifesciences)
- Destibiotina (IBA Lifesciences)
- Tampó d'elució: 100 mM Tris pH 8; 150 mM NaCl; detergent 2x c.m.c; 25 mM destibiotina

PROTOCOL que segueix de l'apartat 2.2

7) Abocar la mostra amb la resina a una columna de purificació i recollir el sotanedant.

8) Rentar 5 vegades amb el tampó de rentat i recollir el sotanedant. El volum de cada rentat equival a un volum de columna.

Nota: el volum de columna correspon al volum de resina que s'està utilitzant, si utilitzes 2 mL de resina, un volum de columna són 2 mL.

9) Eluir 8 vegades amb el tampó d'elució i recollir el sotanedant. El volum de cada elució equival a un volum de columna.

Nota: guardar uns μ L del tampó d'elució per fer el blanc al nanodrop.

- 10) Quantificar en el nanodrop la concentració de proteïna de les 8 elucions, i ajuntar les elucions on hi ha proteïna.

2.3.3 Purificació de la proteïna GlialCAM utilitzant el *tag* 3flag.

MATERIAL

- Resina flag (Invitrogen)
- Pèptid d'elució (Invitrogen)
- Tampó d'elució: 100 mM Tris pH 8; 150 mM NaCl; detergent 2x c.m.c; 0,2 mg/mL del pèptid d'elució.

PROTOCOL que segueix de l'apartat 2.2

- 7) Abocar la mostra amb la resina a una columna de purificació i recollir el sotanedant.
- 8) Rentar 5 vegades amb el tampó de rentat i recollir el sotanedant. El volum de cada rentat equival a un volum de columna.

Nota: el volum de columna correspon al volum de resina que s'està utilitzant, si utilitzes 2 mL de resina, un volum de columna son 2 mL.

- 9) Afegir un volum equivalent a 3 - 4 vegades el volum de columna de tampó d'elució. Incubar 15 minuts a l'orbital.

Nota: guardar uns μL del tampó d'elució per fer el blanc al nanodrop.

- 10) Recollir l'elució i quantificar en el nanodrop la concentració de proteïna.

2.4 CROMATOGRAFIA D'EXCLUSIÓ PER MIDA

La cromatografia d'exclusió per mida (de l'anglès *Size Exclusion Chromatography*, SEC) és una tècnica de separació basada en la mida molecular dels components. La separació s'aconsegueix fent passar la mostra per una columna composta per una resina que

forma porus amb una distribució específica. Les molècules difonen pels porus de la resina, i el seu flux a través de la columna dependrà de la seva mida. Les molècules grans no podran entrar a la resina i cauran per lateral de la columna, travessant la columna abans que les molècules petites, que degut a la seva mida, sí que podran entrar pels diferents porus de la resina i trigaran més temps a travessar tota la columna (**figura 33**).

Existeixen diferents tipus de columnes d'exclusió per mida. El tipus de columna utilitzada dependrà de la mida de la teva proteïna.

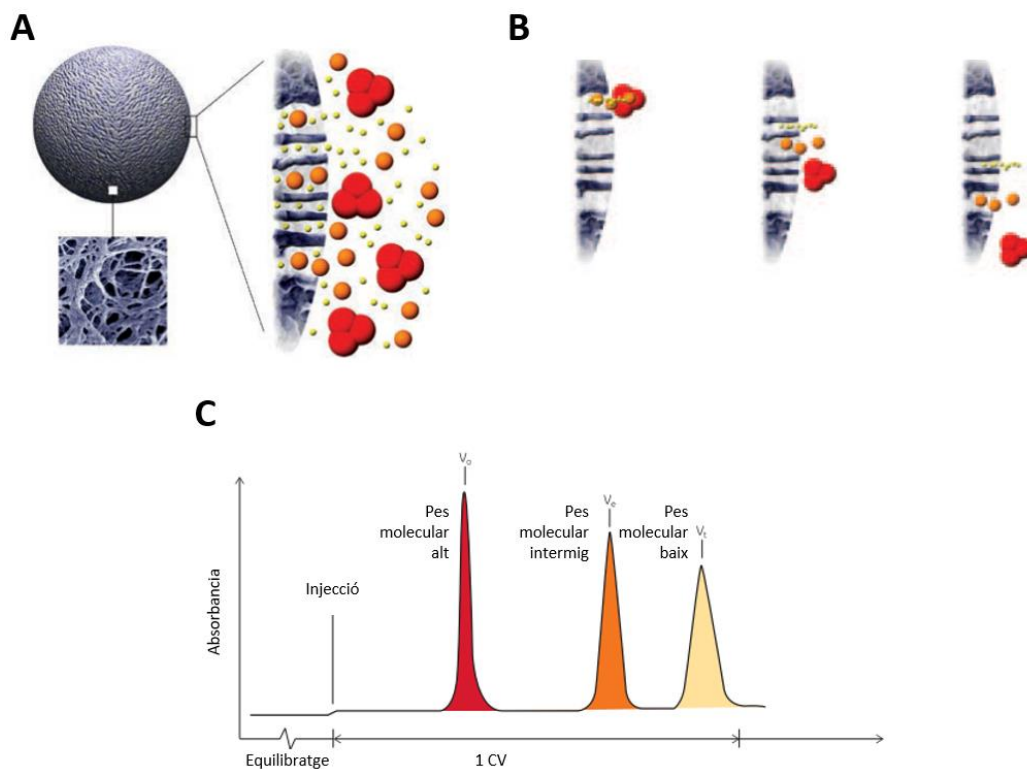


Figura 33. Procés de cromatografia d'exclusió per mida. A) Imatge de la resina d'una columna d'exclusió per mida feta amb un microscopi electrònic. **B)** Esquema de molècules de diferent mida difonent a través dels porus de la resina. **C)** Representació del cromatograma que s'obtidria. Figura modificada de (Healthcare, 2018).

MATERIAL

- Filtres en columna *Amicon Ultra Centrifugal Filter Devices 100 kDa* (Millipore)
- Aigua MilliQ
- Columna de cromatografia d'exclusió per mida *Superdex 200 Increase 10/300 GL*
- Tampó de columna : 100 mM Tris-HCl pH 8; 150 mM NaCl i 2 x c.m.c del detergent

PROTOCOL

Tots els passos es realitzen a 4°C.

1. Concentrar la mostra amb un filtre de columna de 100 kDa (*Amicon Ultra Centrifugal Filter Devices 100 kDa*, Millipore), prèviament equilibrat amb 100 mM Tris-HCl pH 8 i 150 mM NaCl.
2. Passar 150 mL d'aigua MilliQ per la columna *Superdex 200 Increase 10/300 GL* per eliminar l'etanol, i equilibrar-la amb 30 mL del tampó de columna.
3. Injectar la mostra a l'AKTA *pure* i utilitzar el col·lector per recollir la mostra separada per mida.

Nota: no injectar més de la meitat del volum total del *loop* d'injecció.

2.4.1 Funcionament de l'AKTA Pure 25M.

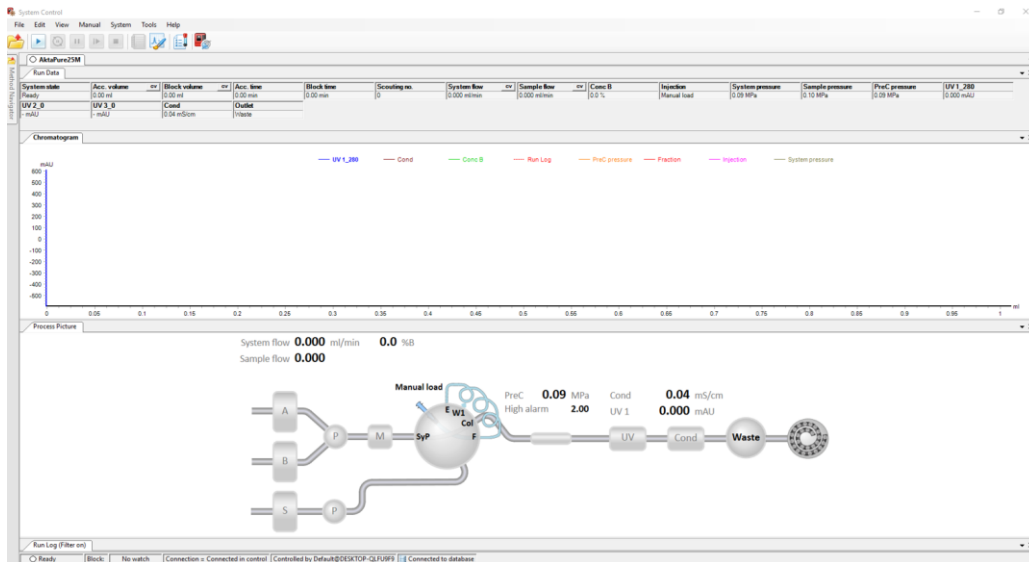
En aquest apartat s'indiquen els diferents passos per utilitzar l'Akta Pure 25M del laboratori. L'explicació està feta utilitzant la columna *Superdex 200 Increase 10/300 GL* de 25 mL.

Nota: durant qualsevol part del procés, si s'observa que s'està formant un *gap* en la part superior de la columna d'exclusió per mida ràpidament s'ha de parar clicant al botó STOP, ja que s'està danyant la columna a causa d'una compactació de la resina.

1. Encendre l'Akta Pure 25M per l'interruptor lateral de la dreta i esperar que la llum de la màquina deixi de pampalluguejar.

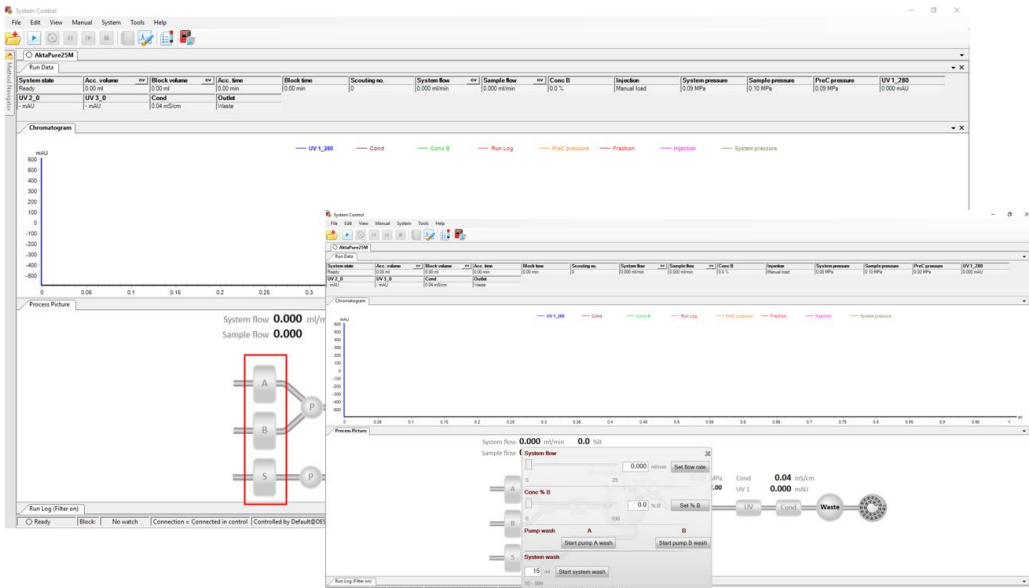
Nota: si triga més de 10 minuts encendre l'ordinador i mirar si la llum de l'Akta deixa de pampalluguejar.

2. Encendre l'ordinador i obrir el programa de l'Akta. S'obriran 3 pantalles, anar a la pantalla del control del sistema (en anglès *System control*) (**imatge 1**).



Imatge 1. Pantalla del control del sistema de l'Akta Pure 25M.

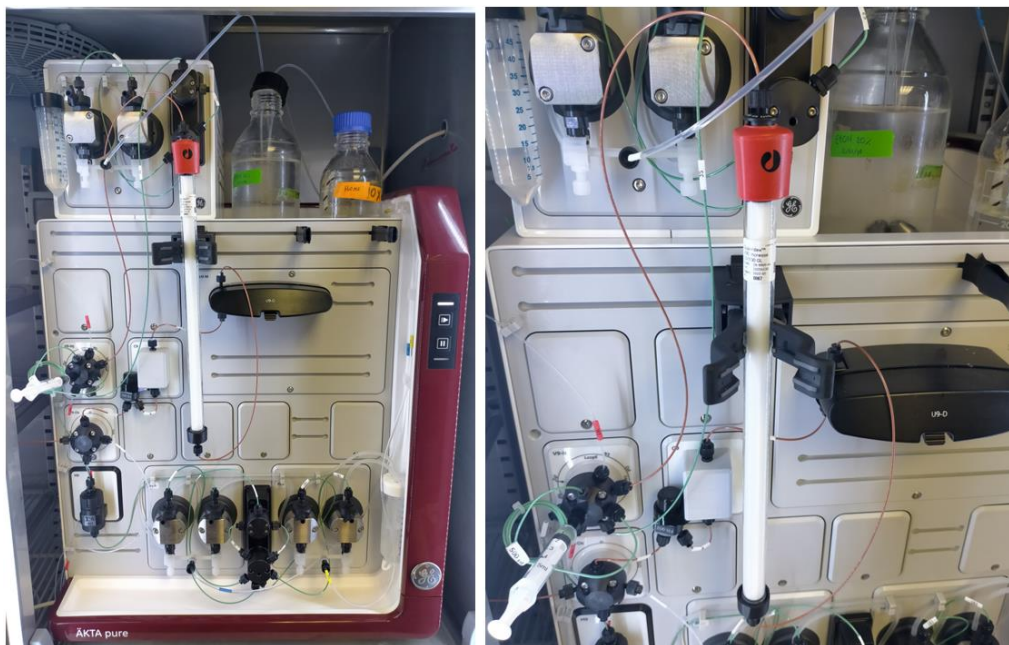
3. Inicialment, tot l'aparell està amb etanol al 20%. En primer lloc, netejar les bombes que s'utilitzaran amb aigua MilliQ clíant sobre la bomba (A, B o S) de la representació dinàmica de l'Akta que mostra la pantalla (imatge 2).



Imatge 2. Pantalla del control del sistema de l'Akta Pure 25M. En la pantalla del fons es senyalen en vermell les diferents bombes de l'Akta on s'ha de clicar perquè aparegui la finestra que mostra la imatge de davant. En aquesta finestra clicar en el botó *Start pump A wash* per iniciar el rentat de la bomba A.

Un cop finalitzat el rentat de bombes, clicar sobre el botó STOP i esperar que la màquina faci el so característic de les Aktes (“pim-pum”).

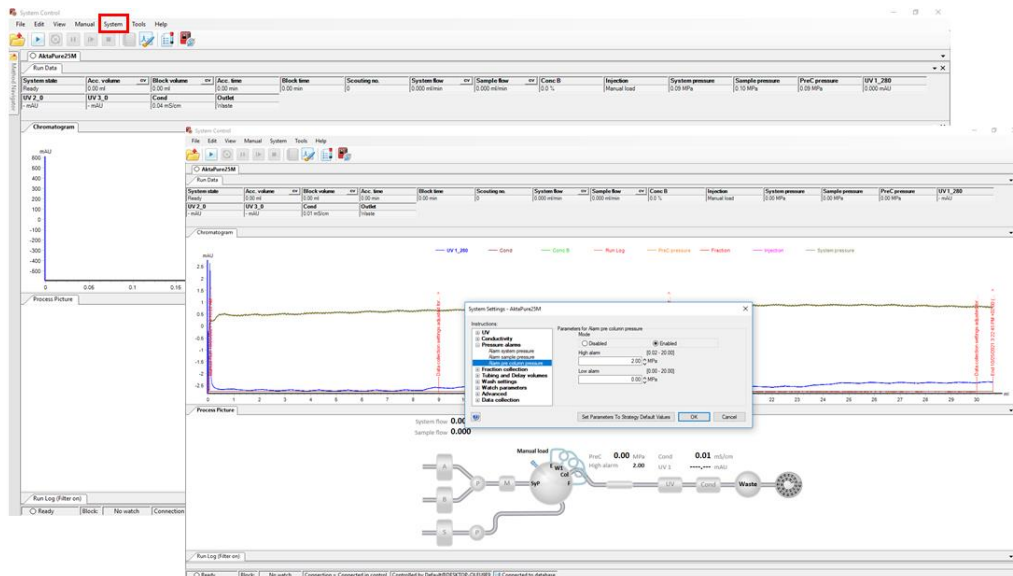
4. Incorporar la columna de cromatografia d'exclusió per mida a l'Akta. Com mostra la **imatge 3**, el cable marró que surt de la vàlvula d'injecció es connecta a la part de dalt de la columna, i el cable marró que entra al detector ultravioleta (UV) es connecta a la part de sota de la columna.



Imatge 3. Instal·lació de la columna *Superdex 200 Increase 10/300 GL* a l'**AKTA pure 25M**. Connectar el tub marró de la vàlvula d'injecció a la part superior de la columna i el tub superior del lector ultravioleta a la part inferior de la columna.

5. Al igual que l'aparell, la columna està guardada amb etanol al 20%. Per tant, en primer lloc netejar la columna amb 100 mL d'aigua MilliQ. Clicar a *System* i apareixerà la pantalla que mostra la **imatge 4**. Afegir la alarma de pressió pre columna (en anglès *pre-column pressure*) a 2,5 mPa i posar un volum de 100 mL. Tot seguit, clicar en la representació dinàmica de l'Akta sobre la bomba que s'utilitzarà (A, B o S) i posar un flux de 0,1 mL/min.

Nota: mirar que la pressió estigui estable i deixar que passi aigua tota la nit sota els paràmetres indicats anteriorment.

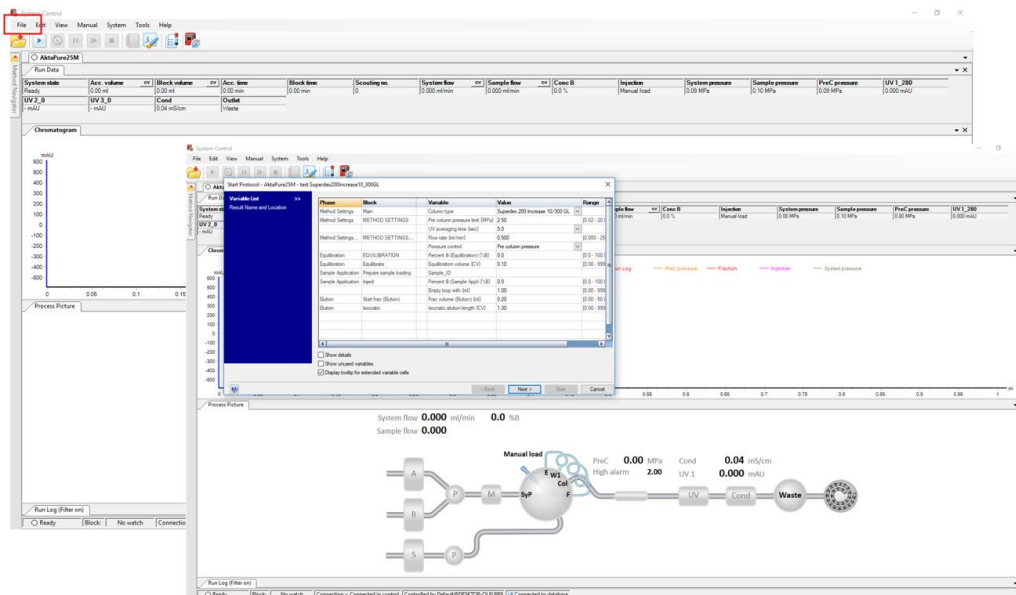


imatge 4. Pantalla del control del sistema de l'AKTA Pure 25M. La pantalla del fons s'ha senyalat el botó *System* que obra la pantalla de davant.

6. Un cop han passat els 100 mL per la columna *Superdex 200 Increase 10/300 GL*, clicar al botó STOP i esperar al so característic de l'akta ("pim-pum").
7. Realitzar els passos 5 i 6 utilitzant el tampó en que es troba la mostra.
8. Quan tenim l'aparell i la columna equilibrats amb el buffer i la mostra preparada per injectar-la a la columna, cliquem sobre el botó *FILE* → *RUN* → i seleccionem el programa que volem fer servir, en aquest cas *AktaPure25M-test Superdex200Increase10_300GL* i s'obrirà la pantalla que mostra la **imatge 5**. Baixar el flux a 0,3 mL/min i revisar que tots els paràmetres estiguin correctes.

Nota: la casella *equilibration volume* està programada a 0,10 significa que la mostra serà injectada al 10% del volum de la columna (2,35 mL aproximadament). Aquest volum el posem per veure que la senyal de la pressió i l'UV són estables abans d'injectar la mostra.

Nota: vigilar que la *pre column pressure limit* sigui la correcta (en la columna *Superdex 200 Increase 10/300 GL* és 2,5 MPa).



Imatge 5. Pantalla del control del sistema de l'Akta Pure 25M. A la pantalla del fons s'ha senyalat el botó *File* que obra la pantalla on seleccions el protocol que vols utilitzar i apareix la pantalla de davant que indica els diferents paràmetres.

9. Un cop a passat tot el volum de la columna (24 mL) parar el programa clicant a l'STOP i esperar al so ("pim-pum").
 10. Recollir les fraccions d'interès, netejar les bombes amb aigua MilliQ i netejar la columna amb 100 mL d'aigua MilliQ com s'ha explicat en els passos 3 i 5, respectivament.
 11. Passar 30 mL d'etanol 20% per la columna, i finalment desconectar-la de l'Akta i guardar-la a la seva caixa a temperatura ambient.
- Nota:** en el cas de l'etanol utilitzar un flux baix (0,2 mL/min) ja que provoca un augment de la pressió.

2.5 RESUM DELS CONSTRUCTES DE LA PROTEÏNA MLC1.

Durant la Tesi, s'han elaborat varis constructes de la proteïna MLC1 amb l'objectiu de poder realitzar diferents estudis i resoldre la seva estructura tridimensional.

En les següents taules estan indicats els diferents vectors d'entrada de la proteïna MLC1 dissenyats amb el sistema gateway (**taula 3**) i els diferents vectors destí de la proteïna MLC1 resumint les seves característiques principals d'expressió, localització i purificació (**taula 4**).

VECTOR ENTRADA	VECTOR
TwinStrep-hMLC1 L1L2	pDONOR221 P1P2
TwinStrep-hMLC1 L1L5R	pDONOR221 P1P5R
His-Thr-MouseMLC1 L1L2	pDONOR221 P1P2
His-Thr-XenopusMLC1 L1L2	pDONOR221 P1P2
His-Thr-ZebrafishMLC1 L1L2	pDONOR221 P1P2
TwinStrep-hMLC1-T2A-GlialCAM-3flag	pDONOR221 P1P5R

Taula 3. Representació dels diferents constructes d'entrada de la proteïna MLC1. La columna de l'esquerra (vector entrada) indica el nom del constructe, la columna de la dreta (vector) indica el vector on s'ha introduït el gen d'interès.

VECTOR DESTÍ	VECTOR	CARACTERÍSTIQUES
hMLC1-3C-GFP-10His (1056)	pPEUTT	Seqüència 3C, una GFP i 10 histidines a l'extrem C-terminal de hMLC1. Expressió correcte i localització cel·lular com la proteïna WT. No es purificava utilitzant la resina Ni-NTA.
Strep-9His-hMLC1 (1124)	pPEUTT	1 tag Strep i 9 histidines a l'extrem N-terminal de hMLC1. Expressió correcte i localització cel·lular com la proteïna WT. Purificació correcte utilitzant la resina Ni-NTA, però no es purificava utilitzant la resina Strep-Tactin.
Strep-9His-hMLC1-3C-GFP (1123)	pPEUTT	1 tag Strep i 9 histidines a l'extrem N-terminal i la seqüència 3C i una GFP a l'extrem C-terminal de hMLC1. Expressió correcte i localització cel·lular com la proteïna WT.

		Purificació correcte utilitzant la resina Ni-NTA, però no es purificava utilitzant la resina Strep-Tactin.
TwinStrep-hMLC1 (1155)	pPEUTT	2 <i>tags</i> Strep a l'extrem N-terminal de hMLC1. Expressió correcte i localització cel·lular com la proteïna WT.
TwinStrep-hMLC1 9His-Thr-hMLC1	pcDNA3	Purificació correcte utilitzant la Resina Strep-Tactin. 9 histidines i la seqüència de reconeixement per l'enzim trombina a l'extrem N-terminal de hMLC1. Expressió correcte i localització cel·lular com la proteïna WT. Purificació correcte utilitzant la Resina Ni-NTA.
9His-3C-hMLC1 (1097)	pcDNA3	9 histidines i la seqüència de l'enzim 3C a l'extrem N-terminal de hMLC1. Expressió correcte, però defecte en la localització cel·lular (internalització). Purificació correcte utilitzant la Resina Ni-NTA.
10His-3C-hMLC1 (1081)	pPEUTT	10 histidines i la seqüència de l'enzim 3C a l'extrem N-terminal de hMLC1. Expressió incorrecte, presenta doble seqüència <i>kozak</i> .

Taula 4. Representació dels diferents constructes de vector destí de la proteïna MLC1. La columna de l'esquerra (vector destí) indica el nom del constructe, la columna del mig (vector) indica el vector on s'ha introduït el gen d'interès i la columna de la dreta (característiques) indica les característiques generals dels diferents constructes.

2.6 WESTERN BLOT

El Western-blot és una tècnica àmpliament utilitzada en biologia molecular per detectar proteïnes específiques de la mostra. Aquesta tècnica ens permet obtenir informació sobre el pes de la proteïna i característiques bioquímiques, com per exemple: els nivells d'expressió, l'oligomerització i els estats de fosforilació. La tècnica es divideix en tres etapes: **electroforesi SDS-PAGE** que separa les proteïnes de la mostra pel seu pes molecular, utilitzant un gel d'acrilamida i tampons amb SDS, que mantenen els polipèptids en un estat de desnaturalització; la **transferència** que transfereix les proteïnes del gel d'acrilamida a una membrana *immobilion-P* (Millipore) per poder

detectar-les amb anticossos; i la **immunodetecció** de les proteïnes d'interès utilitzant anticossos específics.

MATERIAL

Per l'electroforesi SDS-PAGE:

- Extracte de proteïna total
- Tampó de càrrega de les mostres LSB4X (0,4 M Tris-HCl pH 6,8; 80% glicerol; 8% SDS; 0,005% de blau de bromofenol)
- 5% β -mercaptoetanol o 100 mM DTT
- Sistema de *Wester-blot Mini-Protean* (BioRad)
- Font de corrent elèctrica
- Tampó d'electroforesi 10X: Tris base 250 mM; glicina 1,92 M; SDS 1%
- Solució gel separador: 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,1% SDS
- Solució gel concentrador: 0,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,1% SDS
- Acrilamida/Bisacrilamida 40% (BioRad)
- APS 10% (Persulfat d'amoni diluït en aigua)
- TEMED
- Marcador de pes molecular (BioRad)

Per la transferència:

- Sistema de transferència *Trans-Blot turbo* (BioRad)
- Paper *Whatmann*
- Membrana *immobilion-P* (Millipore)
- Tampó ànode: 0,3 M Tris base; 20% metanol en aigua
- Tampó càtode: 40 mM àcid aminocaproic, 20% metanol en aigua
- Metanol

Per la immunodetecció:

- Solució *Ponceau*: 5% àcid acètic; 0,1% ponceau en aigua
- Tampó de rentat TTBS 1X: TBS 1X; 0,1% tritó X-100
- Solució bloqueig: 5% llet diluïda en TTBS 1X
- Anticossos primaris diluïts en la solució bloqueig

- Anticossos secundaris HRP diluïts 1:5000 en la solució bloqueig
- Solució ECL formada per la Solució A+B.
 - Solució A: 5mL Tris base 1M; 110 µL àcid cumàric 90 mM; 250 µL luminol 250 mM; en 45 mL d'aigua.
 - Solució B: 100 µL de H₂O₂ al 30% en 900 µL d'aigua.

PROTOCOL

1. Preparar gels de poliacrilamida en vidres de 1,5 mm utilitzant els volums dels reactius que indica la taula, i afegir la pinta de 1,5 mm de 10 pous. Deixar que els gels polimeritzin.

GEL SEPARADOR (2 x 1,5 mm gels; 20 mL)	7,5%	10%	GEL CONCENTRADOR (2 x 1,5 mm gels; 20 mL)	4%
Acilamida	3,8 mL	5 mL	Acilamida	1 mL
Tampó gel separador	5,2 mL	5,2 mL	Tampó gel separador	2,5 mL
Aigua	11 mL	9,8 mL	Aigua	6,5 mL
APS	200 µL	200 µL	APS	200 µL
TEMED	20 µL	20 µL	TEMED	20 µL

2. Preparar les mostres afegint LSB a una concentració de 1X i l'agent reductor (5% β-mercaptoetanol o 100 mM de DTT).
3. Escalfar les mostres a 56°C durant 3 minuts, en el cas que siguin proteïnes de membrana; en proteïnes citosòliques escalfem a 95°C durant 5 minuts.
4. Incorporar els gels a la cubeta d'electroforesi i omplir la cubeta amb el tampó d'electroforesi 1X (diluir el tampó d'electroforesi 10X amb aigua destil·lada).
5. Retirar la pinta dels gels i carregar els gels amb les mostres dins dels pous juntament amb el marcador de pes molecular.

6. Tancar la cubeta d'electroforesi amb la tapa i connectar-la a una font d'alimentació a un voltatge constant entre 100-120V, fins que el marcador de pes molecular s'hagi separat suficientment per detectar la proteïna d'interès.

Transferència

7. Activar membrana *immobilon-P* amb metanol durant 3 minuts.
8. Preparar els cassets de transferència, col·locant el següent material en aquest ordre: 3 papers *whatmann* humits en el tampó ànode, la membrana *immobilon-P* humida amb el tampó ànode, el gel d'acrilamida humit amb el tampó càtode i 3 papers *whatmann* humits en el tampó càtode.
9. Introduir el casset de transferència dins l'equip *Trans-Blot turbo* i iniciar el programa *BioRad-defined standard* per 1 o 2 mini gels (25V; 1.0 A; 30 minuts).

Immunodetecció

10. Tenyir la membrana amb la solució *Ponceau* per confirmar que la transferència de la proteïna ha anat correctament.
11. Rentar les membranes tenyides amb aigua varies vegades, fins eliminar el *Ponceau*.
12. Bloquejar les membranes amb la solució bloqueig, preparada el mateix dia, durant 1 hora a temperatura ambient.
13. Incubar la membrana amb l'anticòs primari diluït en la solució bloqueig durant 1 hora a temperatura ambient o tota la nit a 4°C.
14. Rentar la membrana amb la solució de rentat TTBS1X durant 10 minuts, tres vegades.
15. Incubar la membrana amb el seu corresponent anticòs secundari-HRP diluït 1:5000 en la solució bloqueig durant 1 hora a temperatura ambient.
16. Rentar la membrana amb la solució de rentat TTBS1X durant 10 minuts, tres vegades.

17. Incubar la membrana amb la solució ECL i revelar la imatge utilitzant *LAS-3000 Imaging System* (Fujifilm), adquirint les imatges digitalment.

2.7 TRACTAMENT AMB ENDOGLICOSILASA F (ENDO-F)

Hem utilitzat el tractament amb Endo-F per avaluar l'estat de glicosilació de la proteïna GlialCAM. La metodologia es basa en tractar la proteïna d'interès amb l'enzim endoglicosilasa F (PNGase-F). La PNGase-F és una enzima que talla entre els residus N-acetilglucosamina i asparagina de molècules que presenten manoses i, complexes d'oligosacàrids. Aquest enzim és el més efectiu per eliminar les N-glicosilacions de les glicoproteïnes.

MATERIAL

- Extracte de proteïna
- Tampó desnaturalitzant 10X (New England BioLabs-NEB)
- Tampó G1 10X (New England BioLabs-NEB)
- NP-40 (New England BioLabs-NEB)
- Endoglicosilasa F (PNGase-F; New England BioLabs-NEB)
- Aigua Milli-Q

PROTOCOL

1. Preparar 20 µg d'extracte de proteïna en 1 µL de tampó G7 10X, arribant a un volum final de 15 µg amb aigua Milli-Q.
2. Desnaturalitzar la proteïna escalfant-la a 100°C durant 10 minuts. Incubar la mostra en gel durant 10 minuts i centrifugar a 17.900 x g durant 10 segons.
3. Afegir a la mostra: 2 µL de NP-40, 2 µL de tampó G1 10X i 1 µL de PNGase-F. Incubar 1 hora a 37°C.
4. Preparar les mostres amb LSB 4X i analitzar-les per WB.

2.8 IMMUNOCITOQUÍMICA

Els estudis de immunocitoquímica ens han permès estudiar la localització de les proteïnes MLC1 i GlialCAM, tots ells en cèl·lules HeLa. Aquesta tècnica permet estudiar la localització subcel·lular de les proteïnes d'interès detectant-les amb anticossos primaris específics que seran detectats per anticossos secundaris de fluorescència. La senyal de fluorescència es detectarà en el microscopi.

MATERIAL

- Cultiu cel·lular en cobreobjectes.
- Placa de cultiu de 24 pous.
- Pinces de cirurgia de precisió.
- Portaobjectes.
- PBS 1X estèril.
- Paraformaldehid 4% en PBS 1X.
- Solució d'autofluorescència: PBS 1X; NH₄Cl 50 mM; Glicina 20 mM
- Solució de permeabilització: PBS 1X; Tritó X-100 0,1%
- Solució de bloqueig: PBS 1X; 10% FBS
- Solució de bloqueig i permeabilitzadora: PBS 1X; FBS 10%; Tritó X-100 0,1%
- Anticossos primaris
- Anticossos secundaris
- Medi de muntatge *Vectashield* (Vector) amb 1-5 µg/mL de DAPI

PROTOCOL

1. Eliminar el medi de cultiu dels cultius cel·lulars i rentar dues vegades amb PBS 1X.
2. Fixar les cèl·lules amb paraformaldehid al 4% durant 20 minuts a temperatura ambient.
3. Retirar el paraformaldehid i rentar les cèl·lules tres vegades amb PBS 1X.
4. Per eliminar l'autofluorescència, incubar les cèl·lules amb PBS 1X i NH₄Cl durant 10 minuts, i tot seguit, incubar amb PBS 1X i glicina 20 mM durant 10 minuts.

5. Incubar les cèl·lules amb la solució bloqueig/permeabilitzadora durant 2 hores a temperatura ambient.

Nota: si la immunocitoquímica no requereix permeabilització, incubar les cèl·lules amb la solució bloqueig (sense detergent) durant 2 hores a temperatura ambient.

6. Incubar les cèl·lules amb l'anticòs primari, utilitzant la solució bloqueig/permeabilitzadora per arribar a la seva corresponent dilució, durant 1 hora a temperatura ambient.

7. Rentar tres vegades les cèl·lules amb la solució bloqueig/permeabilitzadora durant 10 minuts.

8. Incubar a les fosques les cèl·lules amb el corresponent anticòs secundari diluït en la solució bloqueig/permeabilitzadora durant 2 hores a temperatura ambient.

9. Rentar tres vegades les cèl·lules amb PBS 1X durant 10 minuts.

10. Muntar els cobreobjectes en els portaobjectes de vidre utilitzant el medi de muntatge *Vectashield* (Vector) amb DAPI. Assecar l'excés de medi i fixar el cobreobjectes al portaobjectes. Finalment, guardar a 4°C protegit de la llum.

ANÀLISI DE LES DADES

Després de realitzar la immunocitoquímica, utilitzem un microscopi confocal amb *spinning disk* DSU (Olympus) per adquirir imatges dels resultats obtinguts. Aquestes imatges són analitzades utilitzant el programa *Image J*.

Per determinar si la nostra proteïna d'interès es localitza a les unions cel·lulars, a través del programa *Image J*, fem passar una línia recta a través de les dues cèl·lules i obrim el seu perfil d'intensitat (*Analyze > Plot Profile*). Únicament, quan la intensitat de fluorescència és més elevada que la suma de la intensitat de fluorescència de les membranes cel·lulars de cada cèl·lula ($FC > F1 + F2$), s'ha considerat que una proteïna està concentrada a les unions (**figura 34**).

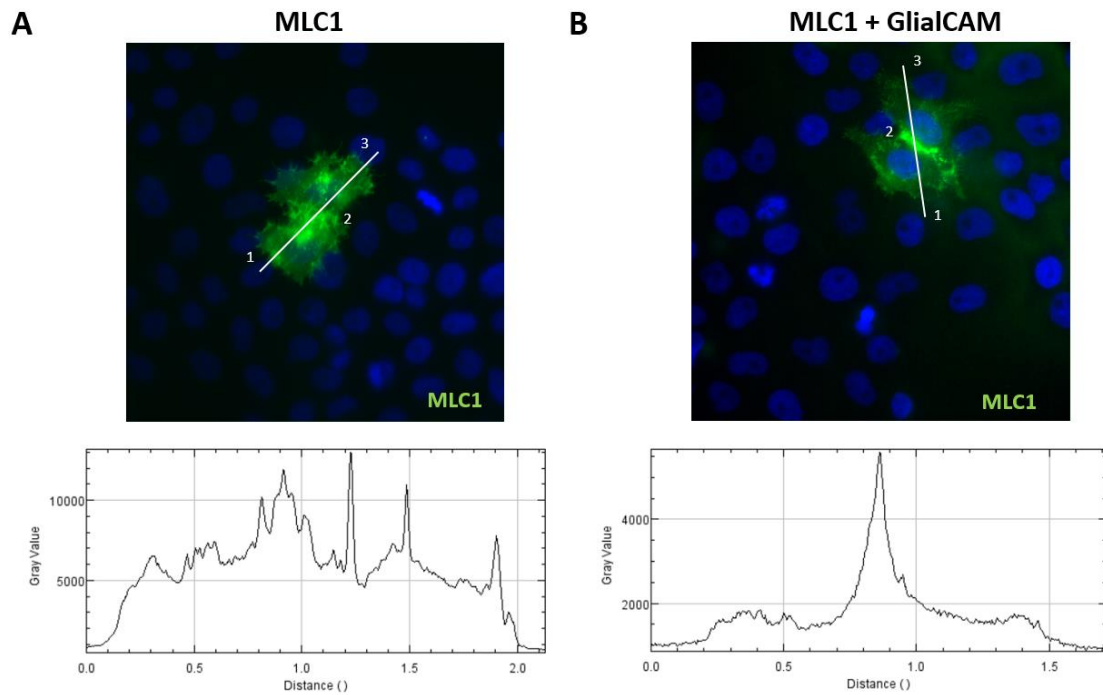


Figura 34. Anàlisi de la localització a les unions cel·lulars utilitzant el programa imageJ. A) La proteïna MLC1 no es concentra a les unions cel·lulars. **B)** La proteïna MLC1 si que es concentra a les unions cel·lulars.

2.9 OBTENCIÓ DE NANOBODIES I MINIBODIES.

Els anticossos s'utilitzen en una ampla varietat de tècniques per detectar, purificar i estabilitzar proteïnes. Els nanobodies corresponen a la regió variable de la cadena pesada d'un anticòs de llama (**figura 35**). Les avantatges que presenten es que són molècules de mida petita, aproximadament 15 kDa, que permeten l'arribada a epítops més amagats; i presenten una elevada estabilitat i solubilitat. En aquesta Tesi, vam contactar amb l'empresa *Hybrigenic*, que compte amb una llibreria sintètica de 3×10^9 nanobodies, per obtenir nanobodies que ens fossin útils per l'estudi d'estructura i funció de la proteïna GlialCAM.

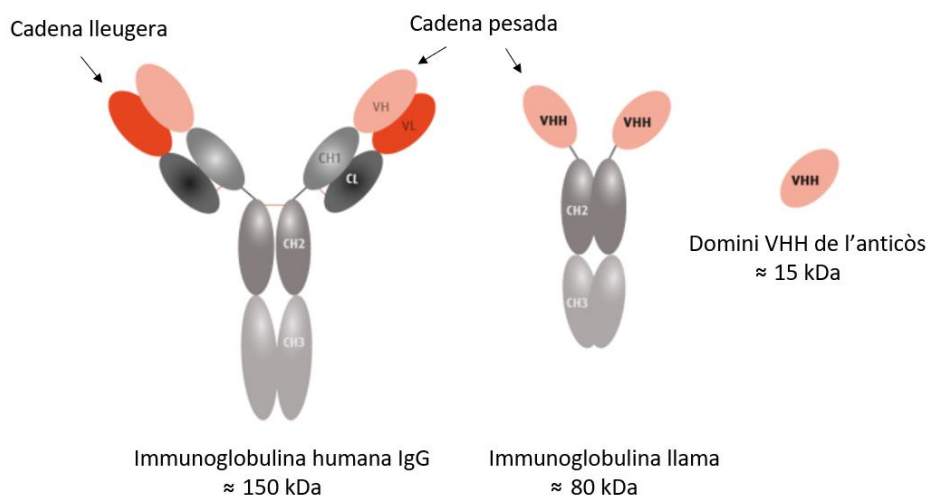


Figura 35. Representació de l'estructura d'una immunoglobulina humana i de llama, marcant el domini VHH de l'anticòs que correspondria al nanobody.

2.9.1 Generació de *nanobodies* (Nb).

MATERIAL

- Bacteris *E. coli* WK6
- Plàsmid d'interès
- Medi LB
- Medi TB: per 1 litre diluir i autoclavar 2,3 g KH_2PO_4 ; 16,4 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; 12 g triptona; 24 g extracte de llevat; 4 mL de glicerol 100%
- Placa agar amb ampicil·lina 1:1000
- Ampicil·lina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$
- Glucosa 20%
- MgCl_2 1 mM
- Tampó TES: 200 mM Tris-Base; 0,5 mM EDTA; 500 mM sucrosa
- Tampó de rentat: 20 mM Tris; pH 7,4; 150 mM NaCl; 10 mM imidazol
- Tampó elució: 20 mM Tris; pH 7,4; 150 mM NaCl; 300 mM imidazol
- Resina Ni-NTA agarosa
- Centricon Amicon Ultra 3 kDa
- 6 erlenmeyers de 2 L amb base rugosa
- Aigua milliQ

PROTOCOL

Dia 1

1. Afegir 3 μL de plàsmid en 50 μL de bactèries *E. coli* WK6 i incubar 20 minuts en gel.
2. Incubar 1 minut a 42°C i deixar en gel 2 minuts perquè baixi la temperatura.
3. Afegir 900 μL de medi LB i deixar recuperar les bactèries 1 h a 37°C.
4. Plaquejar 50 μL de la mostra en una placa d'ampicil·lina 1:1000. Incubar a 37°C tota la nit.

Dia 2

5. Inocular 3 - 4 colònies en 10 mL de medi LB suplementat amb ampicil·lina 1:1000, 2 % de glucosa i 1 mM MgCl_2 .
6. Incubar el precultiu a 37°C i 190 rpm tota la nit.

Nota: deixar el tap del falcon una mica obert per permetre la oxigenació de les bactèries.

7. Preparar i autoclavar 3 erlenmeyers de 2 L de base rugosa que continguin cadascun 330 mL de medi TB.

Dia 3

8. Suplementar els 330 mL de medi TB amb ampicil·lina 1:1000; 0,1 % glucosa i 1 mM de MgCl_2 . Inocular cada erlenmeyer amb 4 mL del precultiu.
9. Incubar els erlenmeyers a 37°C a 170 rpm fins a OD_{600} de 0,7 - 1,1.
10. Afegir 1 mM de IPTG per induir l'expressió del *nanobody*, i deixar incubar a 28°C a 190 rpm tota la nit.

Nota: alternativament, es pot induir l'expressió del *nanobody* a 37°C a 170 rpm durant 4 h.

Dia 4

11. Centrifugar la mostra a $9.000 \times g$ durant 15 minuts a temperatura ambient, i resuspendre el pèl·let de bactèries en 15 mL de tampó TES fred.
12. Barrejar la mostra amb mosca magnètica durant 1 hora a 4°C .
13. Afegir 30 mL de tampó TES diluït 4 vegades amb aigua milliQ, i barrejar la mostra amb mosca magnètica durant 45 minuts a 4°C .
14. Centrifugar la mostra a $10.000 \times g$ durant 30 minuts a 4°C . Incubar el sobrenedant amb 2 mL de resina Ni-NTA agarosa, prèviament netejada i equilibrada, durant tota la nit a 4°C .

Nota: alternativament, es pot incubar el sobrenedant amb la resina durant 3 hores a 4°C , però és menys eficient.

Nota: es pot realitzar un segon xoc osmòtic amb el pèl·let de bactèries per obtenir més quantitat de *nanobody*.

15. Resuspendre el pèl·let en 15 mL de tampó TES fred i deixar barrejant tota la nit a 4°C . Repetir el passos a partir del pas 2 del dia 4, però incubant el sobrenedant amb la resina de Ni-NTA agarosa durant 3 hores.

Dia 5

16. Abocar la mostra unida a la resina a un falcon 50 mL i, centrifugar 5 minuts a $500 \times g$ a 4°C . Descartar el sobrenedant, i ràpidament resuspendre la mostra unida a la resina amb el tampó de rentat.
17. Abocar la mostra a una columna de purificació de plàstic de 25 mL, i rentar la mostra amb 3×10 CV de tampó de rentat.
18. Eluir la mostra amb 6 mL de tampó d'elució. Recollir les elucions en fraccions de 1 mL.
19. Mesurar en el nanodrop la concentració de proteïna de les 6 elucions, i ajuntar aquelles fraccions que presentin proteïna.

20. Abocar l'elució en un centricon Amicon Ultra de 3 kDa, prèviament equilibrat. Realitzar centrifugacions a $3.500 \times g$ a 4°C , i anar afegint 20 mM Tris pH 8; 150 mM NaCl fins diluir la concentració d'imidazol.

Nota: important eliminar l'imidazol de la mostra, ja que si congeléssim la mostra amb imidazol, aquest pot inestabilitzar el *nanobody*.

Nota: en el cas que no tinguem temps d'eliminar l'imidazol, es pot dialitzar la mostra a 4°C durant tota la nit, o acabar d'eliminar l'imidazol i concentrar la mostra el dia següent.

21. Concentrar la mostra a la concentració desitjada, aliquotar-la, congelar-la amb nitrogen líquid i guardar les alíquotes a -80°C .

2.9.2 Generació de *minibodies* (Mb).

Els *nanobodies* (Nb) obtinguts es poden fusionar al fragment constant de l'anticòs (Fc) que proporciona l'empresa *Hybrigenic*, els quals poden ser de diferents espècies (humana, ratolí, conill o cabra). La fusió de la regió variable (VHH) amb la regió constant (Fc) permet la generació dels anomenats *minibodies* (Mb).

La generació de Mb es realitza mitjançant la clonació clàssica (mirar apartat 1.5.1 de metodologia). En aquest cas, els enzims de restricció utilitzats per generar els extrems compatibles entre la regió variable (VHH) i el vector (pFUSErFc) van ser el NotI i el NcoI (*New EnglanBiolabs*), i les plaques d'agar utilitzades per fer créixer les colònies són amb l'antibiòtic zeocina 1:1000 (*Invitrogen*).

MATERIAL

- Plàsmid del Mb 139G1rFc
- 6 -10 plaques 10 cm
- Transfectina
- PBS 1X estèril
- Medi DMEM complementat (10% FBS inactivat; 1% penicil·lina/estreptomicina; 1% glutamina).

- Medi DMEM complementat (sense 10% FBS inactivat; 1% penicil·lina/estreptomicina; 1% glutamina).
- Medi de cultiu Opti-MEM amb Glutamax (Gibco).
- Filtres en columna *Amicon Ultra Centrifugal Filter Devices 100 kDa* (Millipore)

PROTOCOL

1. Transfectar 12 µg del plàsmid Mb 139 G1rFc a cada placa de 10 cm (total 6 - 10 plaques). Mirar protocol de transfecció transitòria amb transfectina (**apartat 3.3.1 de la metodologia**).
2. Després de 24 hores de la transfecció, aspirar el medi de les plaques, rentar amb PBS 1X i afegir 10 mL de medi DMEM sense FBS.
3. Després de 24h, recollir el medi de les plaques (medi 48h després de la transfecció) i afegir 10 mL de medi DMEM sense FBS. Guardar el medi recollit a 4°C.
4. Després de 24h, recollir el medi de les plaques (medi 72h després de la transfecció).
5. Centrifugar els medis de 48h i 72h a 1.100 x g durant 5 minuts a 4°C, per extreure les restes cel·lulars. Passar el sobrenedant a falcons nous.
6. Concentrar els medis de 48h i 72h, utilitzant filtres en columna *Amicon Ultra Centrifugal Filter Devices 100 kDa* de 15 mL. Centrifugar a 2700 x g durant 30 minuts a 4°C.
Nota: hidratar prèviament la membrana del centricon Amicon Ultra 100 kDa amb PBS 1X.
7. Un cop concentrat els medis, anar afegint 1 mL de la solució TBS i centrifugar a 2700 x g durant 3 minuts a 4°C fins eliminar el color vermell (fenols) del medi.
8. Aliquotar la mostra en eppendorfs de 1,5 mL en un volum d'aproximadament 30 µL i guardar-les a -80°C.
9. Realitzar un *comassie*, amb una recta patró de concentració coneguda, per calcular aproximadament la concentració de la teva mostra.

2.10 CITOMETRIA DE FLUX.

La citometria de flux permet immunodetectar els nivells d'expressió a la membrana d'una proteïna. En aquest treball, hem utilitzat aquesta tècnica per analitzar la interacció del *minibody* 139G1 i 139F3 amb la proteïna GlialCAM i, per detectar nivells d'expressió en membrana de diferents mutants de GlialCAM.

MATERIAL

- Cèl·lules HEK control i transfectades
- Tripsina
- Solució de bloqueig: 0,2% FBS en PBS 1X
- Anticòs primari
- Anticòs secundari
- Citòmetre de flux

PROTOCOL

1. Aixecar les cèl·lules HEK 293T per tripsinització (apartat 3.1.1) i resuspendre-les en 500 µL de medi DMEM complementat.
2. Centrifugar a 2.400 x g durant 1 minut a 4°C i descartar el sobrenedant.
3. Resuspendre el pèl·let en 1 mL de PBS 1X, centrifugar a 2.400 x g durant 1 minut a 4°C i descartar el sobrenedant.
4. Repetir el pas 3.
5. Resuspendre els pèl·lets en 1 mL de solució bloqueig i dividir cada condició en 4 grups:
 - **Control negatiu:** 100 µL de solució bloqueig.
 - **Control anticòs primari:** 100 µL de solució bloqueig amb una dilució 1/20 de l'anticòs primari.
 - **Control anticòs secundari:** 100 µL de solució bloqueig amb una dilució 1/20 de l'anticòs secundari.

- **Condicció experimental:** 100 µL de solució bloqueig amb una dilució 1/20 de l'anticòs primari i una dilució 1/20 de l'anticòs secundari.
6. Centrifugar 30 segons a 15.800 x g. Descartar el sobrenedant amb el kitasato.
 7. Resuspendre els pèl·lets del **control anticòs primari i condició experimental** en 100 µL de solució bloqueig + dilució 1/20 de l'anticòs primari. Incubar 30 minuts.
Nota: resuspendre les altres condicions en 100 µL de solució bloqueig.
 8. Centrifugar 30 segons a 15.800 x g i descartar el sobrenedant amb el kitasato.
 9. Resuspendre els pèl·lets en 1 mL de solució bloqueig i centrifugar 30 segons a 15.800 x g. Descartar el sobrenedant amb el kitasato.
 10. Resuspendre els pèl·lets del **control anticòs secundari i condició experimental** en 100 µL de solució bloqueig + dilució 1/20 de l'anticòs secundari. Incubar 30 minuts.
Nota: resuspendre les altres condicions en 100 µL de solució bloqueig.
 11. Centrifugar 30 segons a 15.800 x g i descartar el sobrenedant amb el kitasato.
 12. Resuspendre els pèl·lets en 1 mL de solució bloqueig i centrifugar 30 segons a 15.800 x g. Descartar el sobrenedant amb el kitasato.
 13. Resuspendre els pèl·lets en 500 µL de solució bloqueig i analitzar les mostres per citometria de flux (FACS).

ANÀLISI DE LES DADES.

La citometria de flux et proporciona uns valors de fluorescència que s'han d'analitzar per poder interpretar-los. En aquest exemple, s'explicarà com realitzar els càlculs d'un anticòs d'estudi (Ab') respecte la proteïna WT i un mutant. S'utilitzarà un anticòs control (Abc).

Un cop realitzada la citometria, obtens uns valors de fluorescència mitjana (**taula 5**).

10. Restar a la fluorescència mitjana de la teva proteïna amb l'Ab 1ari + Ab 2ari la fluorescència mitjana inespecífica obtinguda de la teva proteïna només amb l'Ab 2ari (diferència).

11. Dividir el valor anterior (diferència) entre la fluorescència mitjana inespecífica obtinguda només amb l'Ab 2ari (*fold*). El *fold* és les vegades que la senyal augmenta respecte la senyal inespecífica (*background*).
12. Dividir el *fold* de l'anticòs d'estudi (Ab') pel *fold* de l'anticòs control (Abc). S'obté les vegades que l'Ab' s'uneix a la proteïna estudiada respecte l'Abc (Ab'/Abc).
13. Dividir la relació Ab'/Abc de la proteïna estudiada entre la relació de Ab'/Abc de la proteïna WT i multiplicar per 100. D'aquesta manera, s'obté el % de la relació Ab'/Abc de la proteïna d'estudi respecte la proteïna WT (Ratio Ab'/Abc en %).

CONDICIÓ		FLUORESCÈNCIA A MITJANA	DIFERÈNCIA	FOLD	Ab'/ Abc	Ratio Ab'/Abc (%)
WT	Ab 1ari + Ab 2ari	13577	13381	68,3	0,13	100%
WT	Ab' 1ari + Ab 2ari	1909	1713	8,7		100%
WT	/ + Ab 2ari	196				
Mutant	Ab 1ari+ Ab 2ari	22930	22749	125, 7	0,03	23%
Mutant	Ab' 1ari + Ab 2ari	911	730	4		
Mutant	/ + Ab 2ari	181				

Taula 5. Exemple de càlculs a partir dels valors obtinguts per citometria.

3. LÍNIES CEL·LULARS.

La manipulació de cèl·lules en cultiu implica treballar en condicions de màxima esterilitat per no contaminar la mostra. Les mostres sempre seran manipulades sota una campana de flux laminar, i tot el material fungible utilitzat ha de ser estèril i obrir-se dins de la campana.

En aquest treball, s'ha utilitzat dues línies cel·lulars: cèl·lules HeLa i cèl·lules HEK 293. La línia cel·lular HeLa procedeix d'adenocarcinoma de cèrvix humà, caracteritzada per presentar un fenotip epitelial i per tenir incorporades seqüències del virus del papil·loma humà (HPV-18). La línia HEK procedeix de cèl·lules epitelials del ronyó humà i està transformada amb el gen E1A d'adenovirus (Graham et al., 1977). La línia HEK 293T és un derivat de la línia HEK 293 que expressa l'antigen T del virus SV40, que permet la replicació episomal de plàsmids que continguin un origen i una regió promotora primerenca de SV40 (Alwine, 1985). En canvi, la línia HEK 293 6E, que expressen *Epstein-Barr virus nuclear antigen-1* (HEK293-EBNA1 o HEK293E), són la línia cel·lular més utilitzada per realitzar expressions a gran escala (Tom et al., 2008).

3.1 CONDICIONS GENERALS DE CULTIU PER CÈL·LULES ADHERENTS HeLa i HEK 293.

Les condicions de cultiu per cèl·lules HeLa i HEK 293 són: 37°C, 90% d'humitat relativa i 5% de CO₂. El medi de cultiu és el *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, *Biological Industries*) suplementat amb de glutamina, antibiòtics i sèrum fetal boví (FBS). Els antibiòtics utilitzats 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 a 56°C durant 30 minuts per inactivar el complement i els anticossos. Regularment, es duen a terme proves per comprovar l'absència de micoplasma a les cèl·lules. El medi s'ha de canviar cada tres o quatre dies, i quan el cultiu arriba a la màxima confluència s'aixequen les cèl·lules per tripsinització i es sembra el cultiu més diluït.

3.1.1 Tripsinització.

Quan la monocapa de cèl·lules arriba a una confluència aproximadament del 100% de la placa, les cèl·lules s'han de desenganxar per evitar que comencin a morir. Aquest procés s'anomena tripsinització, i tot seguit es tornen a sembrar les cèl·lules a la densitat que es necessiti.

MATERIAL

- Tripsina-EDTA 1X (*Biological Industries*)
- Medi DMEM complementat (10% FBS inactivat; 1% penicil·lina/estreptomycina; 1% glutamina).
- PBS 1X estèril
- Plaques 10 cm
- Kitasato
- Campana de flux vertical

PROTOCOL

1. Eliminar el medi DMEM de la placa amb el kitasato.
2. Rentar les cèl·lules amb PBS 1X estèril i eliminar-lo amb el kitasato.

Nota: important que no quedi medi DMEM, ja que els factors presents en el FBS del medi inhibeixen l'acció de la tripsina.

3. Afegir tripsina i deixar a l'incubador fins que les cèl·lules s'aixequin, aproximadament entre 3 i 5 minuts.

Nota: el volum de tripsina dependrà de la mida de la placa de cultiu. Placa 10 cm afegir 1 mL de tripsina; placa 6 pous afegir 200 µL de tripsina.

4. Resuspendre les cèl·lules amb medi DMEM complementat (el FBS inactivarà la tripsina) i contar les cèl·lules per sembrar a la concentració que es requereixi; o bé, fer un cultiu de manteniment, generalment es fa una dilució 1:10.

3.1.2 Congelació de cèl·lules adherents.

Les cèl·lules eucariotes tenen la capacitat de suportar processos de congelació quan es dona 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.

MATERIAL

- Medi DMEM complementat (10% FBS inactivat; 1% penicil·lina/estreptomicina; 1% glutamina).
- Tripsina
- Dimetil sulfòxid (DMSO) estèril
- PBS 1X estèril
- *Cooler*
- Falcons de 15 mL

PROTOCOL

1. Aixecar les cèl·lules per tripsinització i resuspendre-les en medi DMEM complementat. Explicat en l'apartat 3.1.1.
2. Centrifugar les cèl·lules 5 minuts a 180 x g i eliminar el sobrenadant.
3. Resuspendre el pèl·let de cèl·lules amb medi DMEM complementat que conté un 10% DMSO estèril.
4. Aliquotar en criotubs, aproximadament 1 mL.
5. Dipositar els criotubs en un *cooler* i guardar-ho a -80°C entre 10 i 16 hores.
6. Guardar les al·lotes a -80°C o en nitrogen líquid.

3.1.3 Descongelació de cèl·lules adherents.

La descongelació de les cèl·lules s'ha de fer ràpidament, per eliminar el DMSO que és tòxic per les cèl·lules.

MATERIAL

- Medi DMEM complementat (10% FBS inactivat; 1% penicil·lina/estreptomicina; 1% glutamina).
- Criotub amb cèl·lules congelades

- Bany a 37°C
- Placa de cultius 10 cm

PROTOCOL

1. Descongelar les cèl·lules en un bany a 37°C.
2. Una vegada descongelades, afegir ràpidament 10 mL de medi DMEM complementat.
3. Centrifugar les cèl·lules durant 5 minuts a 180 x *g* i eliminar el sobrenedant.
4. Resuspendre el pèl·let de cèl·lules en 10 mL de medi DMEM complementat i sembrar en placa de 10 cm.
5. Deixar créixer les cèl·lules a l'incubador.

3.2 CONDICIONS GENERALS DE CULTIU PER CÈL·LULES EN SUSPENSÍO HEK 293 6E.

Les condicions de cultiu per cèl·lules en suspensió HEK 293 són: 37°C, 90% d'humitat relativa, 5% de CO₂ i 120 rpm. El medi de cultiu és el *FreeStyle F17 (Thermofisher)* sense suplementar. La suplementació consisteix en afegir al medi: glutamina i àcid plurònic (Freestyle & Cell, n.d.). L'antibiòtic utilitzat és la geneticina G418 que s'afegirà directament al cultiu. Regularment, es duen a terme proves per comprovar l'absència de micoplasma a les cèl·lules. Quan el cultiu arriba a la màxima confluència (aproximadament 3 x 10⁶ cèl·lules/mL), s'afegeix medi per diluir les cèl·lules.

3.2.1 Congelació de cèl·lules en suspensió HEK 293 6E.

MATERIAL

- Medi *FreeStyle F17 (Thermofisher)* complementat
- Dimetil sulfòxid (DMSO) estèril
- PBS 1X estèril
- *Cooler*

- Criotubs

PROTOCOL

1. Contar les cèl·lules amb comptador cel·lular. Les cèl·lules han d'estar en fase exponencial de creixement ($1,2 \times 10^6$ - $1,5 \times 10^6$ cèl·lules/mL). Calcular el total de cèl·lules que tens.
2. Centrifugar les cèl·lules 5 minuts a $100 \times g$ i eliminar el sobrenedant.
3. Resuspendre el pèl·let de cèl·lules amb medi *FreeStyle F17* amb 1% DMSO estèril, portant les cèl·lules a 30×10^6 cèl·lules/mL.
4. Aliquotar les cèl·lules en criotubs, aproximadament 1 mL per criotub.
5. Dipositar els criotubs en un *cooler* i guardar-ho a -80°C entre 10 i 16 hores.
6. Guardar les alíquotes a -80°C o en nitrogen líquid.

3.2.2 Descongelació de cèl·lules en suspensió HEK 293 6E.

MATERIAL

- Criotub amb cèl·lules congelades
- Bany a 37°C
- Medi *FreeStyle F17* (*ThermoFisher*) complementat
- Erlenmeyer base rugosa de 125 mL

PROTOCOL

1. Descongelar les cèl·lules en un bany a 37°C .
2. Una vegada descongelades, posar-les a la base del erlenmeyer amb base rugosa de 125 mL estèril, i ràpidament anar abocant per les parets de l'erlenmeyer 25 mL de medi *FreeStyle F17*.

Nota: no afegir l'antibiòtic (genticina G418).

3. Deixar créixer les cèl·lules a l'incubador durant 2 dies.
4. Passat 2 dies, anar diluint les cèl·lules i anar controlant que es divideixen correctament.
5. Quan les cèl·lules es divideixen correctament, afegir l'antibiòtic (genticina G418), i ja es poden utilitzar per expressar.

3.3 TRANSFECCIÓ CEL·LULAR

En diferents experiments d'aquesta Tesi s'ha realitzat la transfecció transitòria de DNAs en els diferents tipus de línies cel·lulars. La metodologia utilitzada pels diferents experiments de transfecció ha estat la utilització de la transfectina (BioRad) o la polietilenimina (PEI, Polysciences Inc.).

3.3.1 Transfecció transitòria amb transfectina (biorad) en cèl·lules adherents HeLa i HEK 293T.

Protocol explicat per a plaques de 6 pous.

MATERIAL

- Medi de cultiu DMEM complementat (10% FBS inactivat; 1% penicil·lina/estreptomicina; 1% glutamina).
- Medi de cultiu Opti-MEM amb Glutamax (Gibco).
- Cultius cel·lulars HeLa o HEK293 (70 - 80% de confluència)
- PBS 1X
- Transfectina (BioRad)
- DNA plasmídic d'interès

PROTOCOL

1. Sembrar les cèl·lules un dia abans perquè la confluència sigui del 70 - 80% en el moment de la transfecció. (Aproximadament, 420.000 cèl·lules per pou)
2. Preparar una barreja del DNA en un volum final de 250 µL de medi Opti-MEM.
Nota: utilitzar un màxim de 3 µg de DNA total.
3. Preparar una barreja de transfectina en un volum final de 250 µL de medi Opti-MEM. Utilitzar una relació 1:1 DNA:transfectina.
4. Ajuntar les dues barreges, la del DNA i Opti-MEM, amb la de la transfectina i Opti-MEM. Incubar 20 minuts a temperatura ambient.
5. Durant la incubació, retirar el medi de cultiu de les plaques i rentar amb PBS 1X estèril.
6. Afegir 1,5 mL de medi Opti-MEM a cada pou.
7. Un cop han passat els 20minuts d'incubació, afegir la barreja gota a gota per tot el pou procurant que quedi ben repartida per tota la superfície.
8. Incubar 4 hores a l'incubador (37°C, 90% d'humitat relativa i 5% de CO₂).
9. Retirar el medi, rentar les cèl·lules amb PBS 1X estèril i afegir 2 mL de medi DMEM complementat.
10. Deixar les cèl·lules al incubador de 24 a 48 hores perquè s'expressin les proteïnes.

3.3.2 Transfecció transitòria amb polietilenimina HCl max (pei max) en cèl·lules en suspensió HEK 293 6E.

Protocol explicat per 1 litre de cultiu cel·lular.

MATERIAL

- Cultiu cel·lular HEK 293 6E.
- Medi de cultiu FreeStyle 293 (*Life Technologies*)

- Polietilenimina 1 mg/mL (PEI, Polysciences Inc.)
- DNA plasmídic d'interès.
- 2 Erlenmeyers de cultiu de 2L

PROTOCOL

1. Sembrar les cèl·lules a 1×10^6 cells/mL un dia abans perquè les cèl·lules estiguin per sobre de 2×10^6 cells/mL en el moment de la transfecció.
2. Diluir les cèl·lules a $1,8 \times 10^6$ cells/mL.

Nota: important afegir medi nou en el moment de la transfecció, per diluir els metabòlits que produeixen les cèl·lules, ja que aquests poden disminuir els nivells de transfecció.

3. Preparar una barreja de DNA en un volum final de 50 mL de medi FreeStyle. Utilitzar un ratio de 1 mg DNA: 1 mL de medi de cultiu.
4. Preparar una barreja de PEI max en un volum final de 50 mL de medi Free-Style. Utilitzar un ratio de 1 mg DNA: 4 μ L de PEI max.
5. Ajuntar les dues barreges, la del DNA i FreeStyle amb la de la PEI max i FreeStyle. Incubar 3 minuts a temperatura ambient.
6. Després de la incubació, afegir la barreja al cultiu cel·lular i deixar les cèl·lules al incubador durant 48 hores perquè la proteïna s'expressi.

Nota: al afegir els 100 mL de barreja hem de recalcular quina concentració de cèl·lules tenim en el moment de la transfecció.

RESULTATS

**1. BASES MOLECULARS DELS MUTANTS DE LA
PROTEÏNA GLIALCAM LOCALITZATS EN EL
DOMINI IgV.**

La Leucoencefalopatia Megalencefàlica amb Quists subcorticals (*Megalencephalic Leukoencephalopathy with subcortical Cysts*, MLC) és una malaltia minoritària causada per mutacions en el gen *MLC1* o mutacions en el gen *GLIALCAM*. Estudiant els pacients afectats per MLC amb mutacions a *GLIALCAM*, es va observar dos fenotips diferents: un fenotip clàssic causat per mutacions recessives (MLC2A), on la simptomatologia que presentaven els pacients era la mateixa que l'observada en pacients amb mutacions en el gen *MLC1*; i un fenotip benigne, causat per mutacions dominants (MLC2B) on els pacients mostraven una millora de la simptomatologia amb el temps.

Les mutacions en el gen *GLIALCAM* són responsables del 20% dels pacients afectats per MLC. Totes les mutacions, identificades en pacients MLC, es localitzen a la regió extracel·lular de la proteïna, majoritàriament en el domini IgV (van der Knaap et al., 2012). S'ha observat que la majoria de les mutacions puntuals de *GlialCAM* no afecten els nivells d'expressió de la proteïna, però sí que s'observa un defecte en la localització de *GlialCAM* a les unions cel·lulars (Arnedo et al., 2014; López-Hernández, Sirisi, et al., 2011). Les dues úniques mutacions que afecten l'expressió de la proteïna *GlialCAM* són la mutació p.L23H, que efecte el pèptid senyal; i la mutació p.W263X, que genera un codó stop provocant la truncació de la proteïna (Arnedo et al., 2014).

Estudis *in vitro*, d'interacció de proteïnes mitjançant la tècnica Split-TEV, van permetre classificar les mutacions identificades en pacients MLC en tres subgrups: a) mutacions recessives (MLC2A) que mostren una reducció d'interacció amb la proteïna nativa (*Wild Type*; WT) i defectes en l'arribada a les unions cel·lulars, b) mutacions dominants (MLC2B) tipus 1 (D1) que, igual que les anteriors, mostren una reducció a interaccionar amb la proteïna WT i defectes en l'arribada a les unions cel·lulars i c) les mutacions dominants (MLC2B) tipus 2 (D2) que no presenten cap defecte d'interacció amb la proteïna WT, però mostren defectes en l'arribada a les unions cel·lulars (**taula 6**).

HERÈNCIA	DEFECTE BIOQUÍMIC	MUTACIÓ
Recessiva	Homooligomerització CIS Arribada a les unions cel·lulars	R92Q, R98C
Dominant tipus 1 (D1)	Homooligomerització CIS Arribada a les unions cel·lulars	G89D, G89S i R92W
Dominant tipus 2 (D2)	Arribada a les unions cel·lulars	Q56P, S59N i D128N

Taula 6. Classificació de les mutacions de GlialCAM, localitzades en el domini IgV, identificades en pacients efectets per MLC.

Com s'observa en altres proteïnes IgCAM, les interaccions cis i trans són importants per dur a terme les seves funcions i es requereixen per la correcta adhesió cel·lular (Narita et al., 2011). Estudis estructurals de diverses IgCAM mostren que les mutacions patològiques afecten als residus localitzats en els dominis encarregats de les interaccions. Per exemple, la resolució de l'estructura de la IgCAM *neurofascin* va permetre identificar setze mutacions en pacients localitzades a la regió responsable de realitzar les interaccions homofíliques (Liu et al., 2011). Aquestes mutacions acostumen a afectar les habilitats adhesives de les molècules d'adhesió sense alterar la seva expressió (Nagaraj et al., 2009).

Amb l'objectiu d'estudiar les mutacions de GlialCAM identificades en pacients efectets per MLC, vam generar un model bioinformàtic del homodímer de GlialCAM per poder localitzar la disposició de les mutacions i estudiar les bases moleculars que determinen la seva herència recessiva (MLC2A) o dominant (MLC2B).

Els resultats d'aquest primer capítol estan publicats a (Elorza-Vidal et al., 2020).

1.1 DESENVOLUPAMENT D'UN MODEL BIOINFORMÀTIC DE L'HOMODÍMER DE GlialCAM.

Per poder estudiar les bases bioquímiques que determinen el comportament recessiu o dominant de les mutacions de GlialCAM, el Dr. Xabi Elorza Vidal, amb la col·laboració del Dr. Juan Fernández Recio, va realitzar un model estructural de l'homodímer de GlialCAM basat en homologia amb la proteïna CAR (*Coxsackievirus-Adenovirus Receptor*). El model inicial suggeria l'existència d'interaccions intermoleculares entre els residus aspàrtic 129

i (D129) arginina 92 (R92) i els residus arginina 64 (R64) i glutàmic 86 (E86), però experiments de *cross-link* mutant aquests residus a cisteïnes i analitzant-los per WB mostraven la formació de dímers en els mutants individuals E86C i R92C.

Els resultats obtinguts de *cross-link* suggerien que el residu E86 d'una molècula de GlialCAM havia d'estar pròxim al residu E86 de l'altra molècula de GlialCAM. A causa de la càrrega negativa del glutàmic (E) vam hipotetitzar que potser, pròxim al residu E86, havia algun residu amb carga positiva permetent l'unió entre càrrega positiva-negativa. Analitzant amb més detall el model inicial de l'estructura de l'homodímer de GlialCAM es va observar que el residu E86 d'un monòmer de GlialCAM estava proper a la lisina 68 (K68) d'un altre monòmer de GlialCAM. Aquests resultats van ser confirmats per experiments de *cross-link* i mutagènesi realitzats pel Dr. Xabi Elorza Vidal.

A causa que el model del homodímer de GlialCAM no concordava amb els resultats obtinguts per *cross-link* i mutagènesi, es va realitzar un nou model utilitzant el modelatge per *docking* i imposant les restriccions experimentals observades anteriorment. Aquest nou model va permetre identificar una possible superfície d'interacció cis entre dues molècules de GlialCAM que permetia la formació del homodímer. La zona d'interacció es localitzava en el domini IgV i estava formada per les superfícies de les mateixes làmines β de cada molècula de GlialCAM que comprenien des del residu E86 fins el residu R92 (**figura 36**).

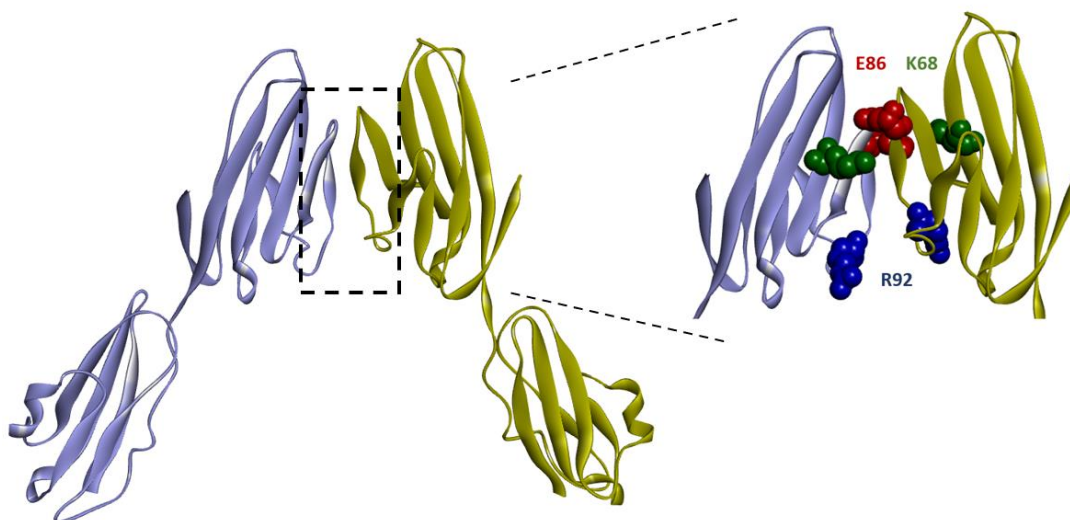


Figura 36. Representació del model bioinformàtic del homodímer de GlialCAM. Dues molècules de GlialCAM interactuant en cis a través del domini IgV. Amplificació del domini IgV senyalant el aminoàcids que comprenen la zona d'interacció cis aspàrtic 86 (E86), lisina 68 (K68) i arginina 92 (R92).

Per comprovar que la superfície d'interacció comprenia des del residu E86 fins el residu R92, el Dr. Xabi Elorza Vidal va mutar a cisteïnes tots els residus que la formaven (E86C, I88C, T90C, R91C i R92C), amb la finalitat d'observar la formació de *cross-links* gràcies a la formació de ponts disulfurs que generen les cisteïnes. Anàlisis per WB, sense la presència d'un agent reductor (- DTT), confirmaven la formació de dímers en tots els mutants generats. Com a control, es va generar el mutant Q81C localitzat fora la zona d'interacció cis. Tractant els extractes cel·lulars amb un agent reductor (+ DTT), s'observava una eliminació dels dímers, confirmant que els dímers dels mutants de cisteïnes eren formats pels ponts disulfurs que formaven els residus mutats a cisteïnes (figura 37A).

Estudis d'immunocitoquímica dels diferents mutants mostraven un defecte de localització a les unions cel·lulars, excepte el mutant E86C que mostrava un increment aproximadament del 90% a les unions cel·lulars (figura 37B).

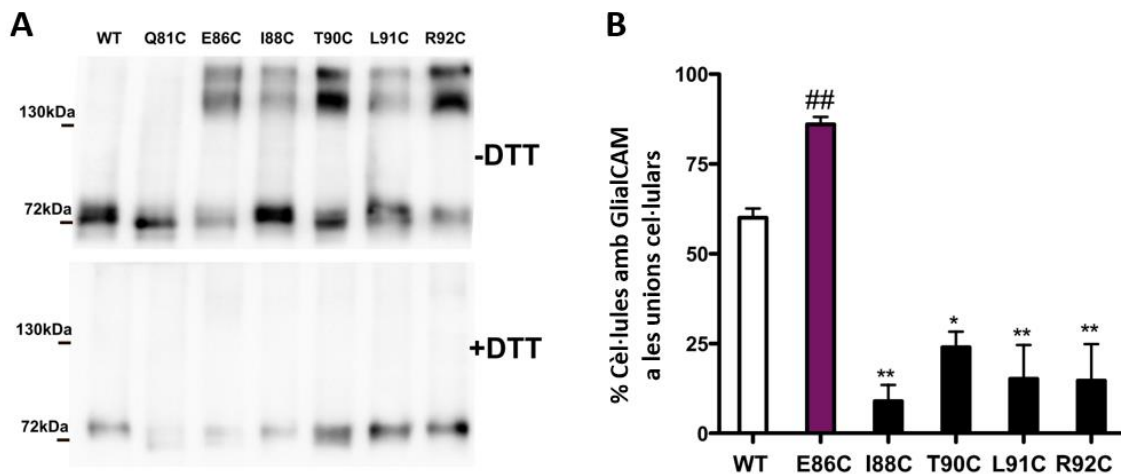


Figura 37. Estudis de la zona d'interacció cis entre dues molècules de GlialCAM a través de *cross-links*. A) WB del *cross-link* de cisteïnes en absència i presència de 100 mM de DTT dels següents residus mutats a cisteïnes: Q81C, E86C, I88C, T90C, L91C i R92C. GlialCAM WT es utilitza com a control negatiu. Els dímers són observats en els mutants E86C, I88C, T90C, L91C i R92C a 140 kDa. WB representatiu de tres experiments diferents. (B) Percentatge a les unions cel·lulars de GlialCAM E86C (230 cèl·lules), I88c (177 cèl·lules), T90C (185 cèl·lules), L91C (123 cèl·lules) i R92C (91 cèl·lules) comparats amb GlialCAM WT (198 cèl·lules). El gràfic representa la mitjana \pm SEM. * $P < 0,05$ i ** $P < 0,01$ en el test de comparació múltiple ANOVA Bonferroni de tres experiments diferents. ## $P < 0,01$ en el test *T-student* comparant amb el WT de tres experiments diferents.

Per altra banda, per confirmar que la superfície d'interacció cis comprenia des del residu E86 fins el R92, es va introduir una glicosilació a la superfície d'interacció la qual hauria

d'actuar com una mutació dominant. Es va generar el mutant isoleucina 88 asparagina (I88N) que introduïa una glicosilació en la possible superfície d'interacció cis, i com a control es va generar el mutant prolina 76 asparagina (P76N) que incorporava una glicosilació fora de la zona d'interacció (**figura 38A**). Anàlisis per WB mostraven un augment del pes molecular dels dos mutants de GlialCAM (I88N i P76N) comparat amb la proteïna WT degut a la introducció de la glicosilació (**figura 38A**), confirmant la introducció d'una glicosilació en la proteïna GlialCAM.

Tot seguit, vam analitzar l'efecte dominant que provocava la proteïna GlialCAM mutada contra l'arribada de la proteïna GlialCAM WT a les unions cel·lulars. Per fer-ho, vam generar constructes que expressaven, al mateix temps i amb la mateixa estequiometria, GlialCAM WT o GlialCAM mutada amb la GlialCAM WT gràcies al pèptid T2A. Els resultats obtinguts mostraven un defecte dramàtic en l'arribada a unions cel·lulars de la proteïna WT causat pel mutant I88N (I88N-T2A-WT) comparat amb la proteïna WT (WT-T2A-WT). En canvi, el mutant P76N provocava una lleugera disminució de GlialCAM a les unions cel·lulars (P76N-T2A-WT) comparat amb la proteïna WT (WT-T2A-WT) (**figura 38B**).

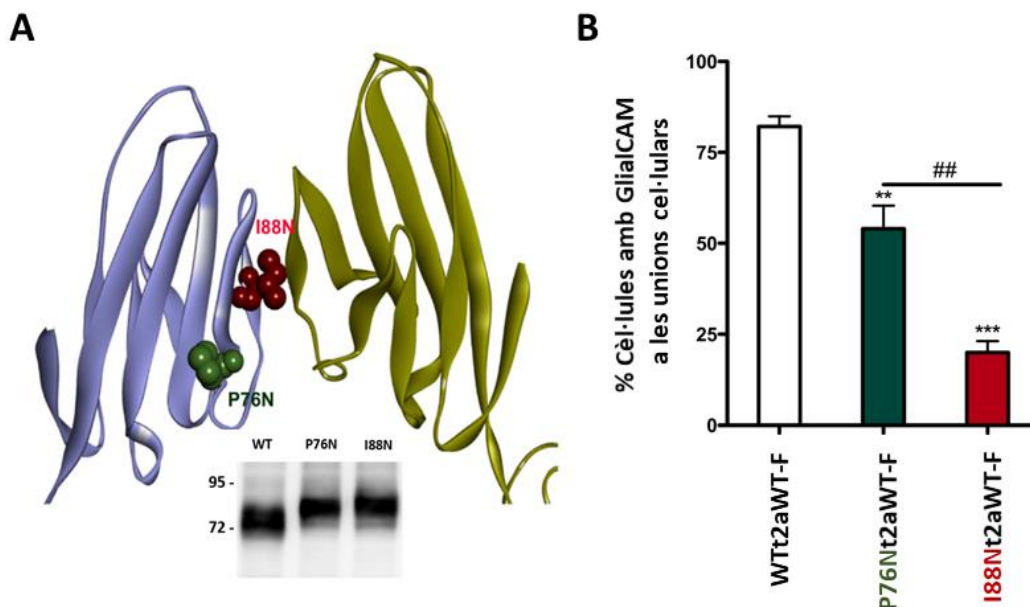


Figura 38. Estudis de la zona d'interacció cis entre dues molècules de GlialCAM a través de glicosilacions. A) Model tridimensional de la interacció de dues molècules de GlialCAM a través del domini IgV mostrant la posició de dues glicosilacions introduïdes, I88N en la regió d'interacció i P76N com a control. Western blot de cèl·lules HEK 293T transfectades amb GlialCAM 3flag o amb la introducció dels dos llocs de glicosilació detectades amb l'epítot *flag*. **B)** Assaig bioquímic de dominància de GlialCAM WT arribant a les unions cel·lulars coexpressat amb els diferents mutants de glicosilació. Quantificació de GlialCAM amb el *tag 3flag* a les unions cel·lulars quan és coexpressat amb el constructe T2A amb GlialCAM WT (232 cèl·lules), mutant P76N (174 cèl·lules) i el mutant I88N (176 cèl·lules). El gràfic representa la mitjana \pm SEM. ** P < 0,01, *** P < 0,001 quan comparàvem amb la coexpressió amb el WT. A més, vam

comparar amb el mutant P76N per diferenciar millor els efectes recessius i dominants. ## $P < 0,01$ quan comparàvem el mutant I88N amb el mutant P76N en el test de comparació múltiple ANOVA Bonferroni de tres – quatre experiments diferents.

Els resultats obtinguts, analitzant els mutants de glicosilació i els *cross-links* a través dels mutants de cisteïnes, confirmaven que la superfície d'interacció obtinguda amb el nou model estructural del homodímer de GlialCAM, comprenia des del residu E86 fins el R92. A més, tant els estudis de dominància del mutant I88N com els defectes en la localització a les unions cel·lulars observats en els mutants a cisteïnes suggerien que la disrupció de la superfície d'interacció provocava un defecte a la proteïna GlialCAM tal com s'observava en altres IgCAM, com la *neurofascin* (Liu et al., 2011) o la *nectin-1* (Narita et al., 2011).

1.2 ESTUDI DELS MUTANTS DE GlialCAM IDENTIFICATS EN PACIENTS MLC LOCALITZATS A LA SUPERFÍCIE D'INTERACCIÓ CIS.

El model estructural del homodímer de GlialCAM mostrava que les mutacions dominants de GlialCAM (MLC2B) de tipus 1 es localitzaven a la superfície d'interacció cis (p.G89S, p.G89D i R92W). En canvi, les mutacions recessives de GlialCAM (MLC2A) es localitzaven fora de la superfície d'interacció (p.K68M, p.R98C, p.T132N), excepte l'arginina 92 glutamina (R92Q).

Els resultats obtinguts dels experiments de *cross-link* dels residus que comprenien la superfície d'interacció cis, mostraven que el mutant E86C presentava un increment en la localització a les unions cel·lulars comparat amb la proteïna WT (**figura anterior 38**). Probablement, aquest increment a les unions cel·lulars era degut al fet que la mutació E86C proporcionava una conformació més estable del homodímer de GlialCAM. Aprofitant aquest possible augment d'estabilitat, vam generar els dobles mutants E86C/R92Q i E86C/R92W per analitzar si el mutant E86C era capaç de revertir el defecte de trànsit a les unions cel·lulars que generaven les mutacions R92Q i R92W.

Estudis d'immunocitoquímica no mostraven diferències significatives de l'arribada a les unions cel·lulars entre el doble mutant E86C/R92Q i la proteïna WT. En canvi, el doble

mutant E86C/R92W si que mostrava diferències significatives d'arribada a les unions cel·lulars comparat amb la proteïna WT (**figura 39**).

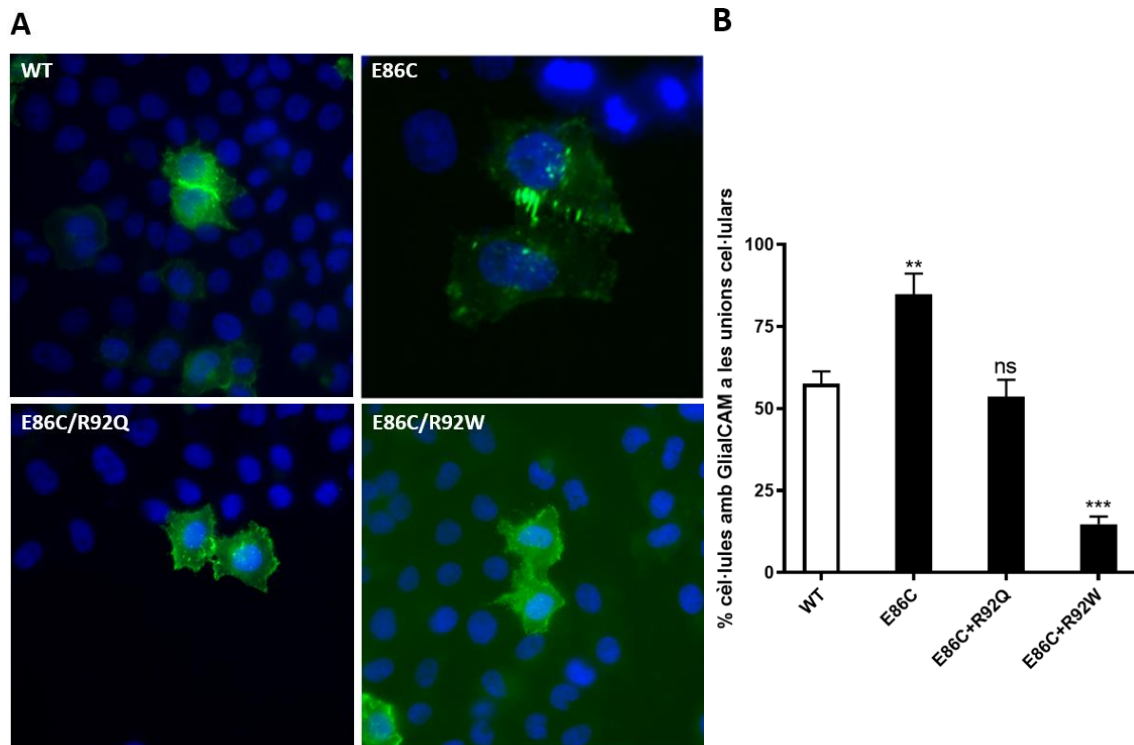


Figura 39. Assaig de localització a les unions cel·lulars de la proteïna GlialCAM WT i els mutants E86C, E86C/R92Q i E86C/R92W **A)** Imatges d'immunofluorescència de la proteïna GlialCAM WT i els mutants E86C, E86C/R92Q i E86C/R92W detectats amb l'anticòs anti-flag. **B)** Quantificació dels mutants de GlialCAM E86C (298 cèl·lules), E86C/R92Q (356 cèl·lules) i E86C/R92W (310 cèl·lules), on la localització a les unions cel·lulars es compara amb la proteïna GlialCAM WT (301 cèl·lules). El gràfic representa la mitjana \pm SEM. ns = no diferències estadístiques i *** $P < 0,001$ en el test de comparació múltiple ANOVA Bonferroni comparat amb el WT. Resultats de tres experiments diferents.

Aquests resultats mostraven per primera vegada una diferència entre les mutacions R92Q i R92W. L'estabilització proporcionada pel mutant E86C revertia el defecte de trànsit a les unions cel·lulars que provocava la mutació recessiva R92Q, però no era capaç de revertir el defecte de trànsit a les unions cel·lulars que provocava la mutació dominant R92W.

Tot seguit, per entendre el mecanisme de dominància que efecteva el residu R92, es van generar varis mutants d'aquest residu a diferents aminoàcids, i es va analitzar si provocaven un efecte dominant o recessiu a la proteïna WT. Estudis de dominància, utilitzant el pèptid T2A, mostraven que la mutació del residu R92 a un aminoàcid petit

alanina (R92A) no provocava un efecte dominant, en canvi les altres mutacions (R92D, R92C, R92Y i R92W) sí (figura 40).

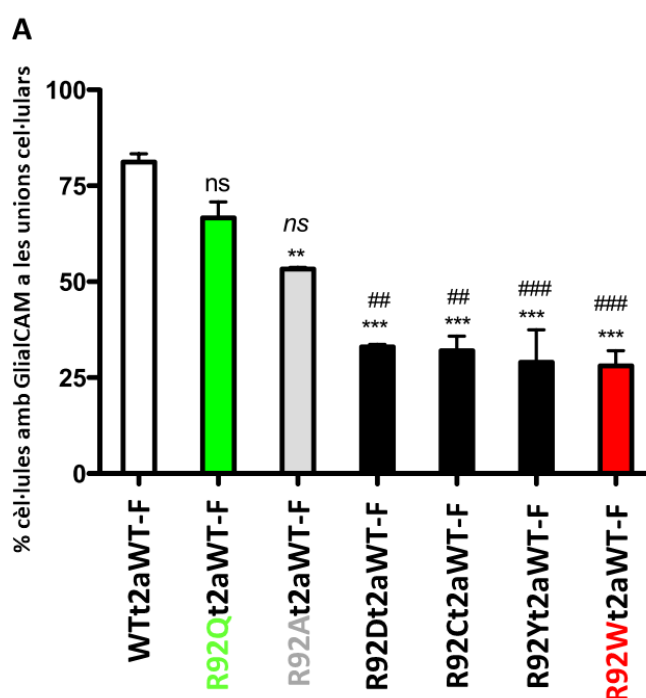


Figura 40. Assaig bioquímic de dominància de GialCAM WT arribant a les unions cel·lulars coexpressat amb els diferents mutants R92. Quantificació de GialCAM amb el tag 3flag a les unions cel·lulars coexpressat amb el constructe T2A amb GialCAM WT (130 cèl·lules), mutant R92Q (115 cèl·lules), R92A (94 cèl·lules), R92D (127 cèl·lules), R92C (114 cèl·lules), R92Y (115 cèl·lules) i R92W (128 cèl·lules). El gràfic representa la mitjana \pm SEM. ns = no diferències estadístiques ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ quan comparàvem amb la coexpressió amb el WT. A més, vam comparar amb el mutant R92Q per diferenciar millor els efectes recessius i dominants. ns = no diferències estadístiques ### $P < 0,01$ i #### $P < 0,001$ quan comparàvem el mutant R92Q en el test de comparació múltiple ANOVA Bonferroni de tres – quatre experiments diferents.

Aquests resultats suggerien que els mutants generats en el residu R92 probablement provocaven una desestabilització de la superfície d'interacció cis de la proteïna GialCAM, afectant la seva homooligomerització. Degut a l'efecte dominant que provocaven les mutacions a aspàrtic (D) o cisteïna (C) en el residu R92, vam voler caracteritzar el patró d'interacció de la superfície d'interacció cis de la proteïna GialCAM.

Analitzant el model bioinformàtic del homodímer de GialCAM, vam observar que l'arginina 96 (R96) estava encarada al residu R92 de l'altra molècula de GialCAM, suggerint que en la regió inferior de la superfície d'interacció cis entre dues molècules de GialCAM es produïa una lleugera repulsió produïda per les dues càrregues positives

entre els residus R92 i R96. Per confirmar aquesta hipòtesi, vam canviar la càrrega positiva de l'arginina (R) per la càrrega negativa que proporcionava l'aspàrtic (D) generant els mutants R92D i R96D. Per altra banda, per crear la mateixa repulsió que hipotetitzàvem que succeïa amb la proteïna WT, vam generar el doble mutant R92D/R96D. Estudis d'immunocitoquímica mostraven que els dos mutants individuals (R92D i R96D) presentaven un defecte a l'arribada a les unions cel·lulars respecte la proteïna WT. En canvi, el doble mutant R92D/R96D no mostrava diferències significatives respecte la proteïna WT (**figura 41**).

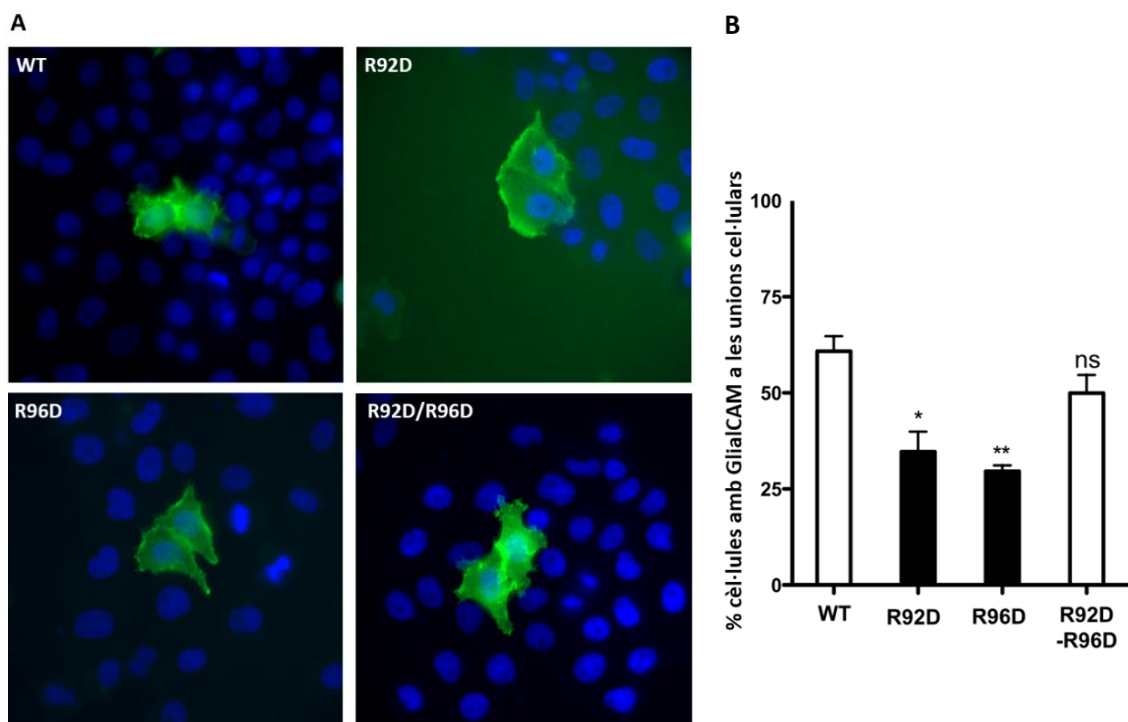


Figura 41. Assaig de localització a les unions cel·lulars de la proteïna GlialCAM WT i els mutants R92D, R96D i R92D/R96D **A)** Imatges d'immunofluorescència de la proteïna GlialCAM WT i els mutants R92D, R96D i R92D/R96D detectats amb anti-flag. **B)** Quantificació de GlialCAM WT marcada amb *3flag* (235 cèl·lules) i els mutants de GlialCAM R92D (240 cèl·lules), R96D (293 cèl·lules) i el doble mutant R92D/R96D (278 cèl·lules), on la localització a les unions cel·lulars és comparada amb la proteïna WT. El gràfic representa la mitjana \pm SEM. ns = no diferències estadístiques, * $P < 0,05$ i ** $P < 0,01$ en el test de comparació múltiple ANOVA Bonferroni comparat amb el WT. Resultats de tres experiments diferents.

Aquests resultats confirmaven la nostre hipòtesi que suggeria que per la correcta conformació del homodímer de GlialCAM havia de crear-se una lleugera repulsió en la regió inferior de la superfície d'interacció cis. Els resultats obtinguts demostraven que aquesta repulsió era creada per les dues càrregues positives dels residus R92 i R96 localitzats en la regió inferior de la superfície d'interacció cis.

1.3 MODEL DE CÀRREGUES DE LA SUPERFÍCIE D'INTERACCIÓ CIS LOCALITZAT EN EL DOMINI IgV DE LA PROTEÏNA GlialCAM.

Els diferents resultats obtinguts suggereixen l'existència d'una superfície d'interacció cis entre dues molècules de GlialCAM permetent la formació del homodímer de GlialCAM. Aquesta superfície d'interacció es localitzaria en el domini IgV, i estaria formada per les mateixes superfícies de les làmines β de cada molècula de GlialCAM que comprendrien des del residu E86 fins el residu R92. La conformació d'aquesta superfície d'interacció estaria formada per una atracció electrostàtica en la regió superior formada per l'atracció entre les càrregues negatives del glutàmic 86 (E86) i les càrregues positives de la lisina 68 (K68), i una lleugera repulsió electrostàtica en la regió inferior formada per les càrregues positives de l'arginina 92 (R92) i 96 (R96) (**figura 42**).

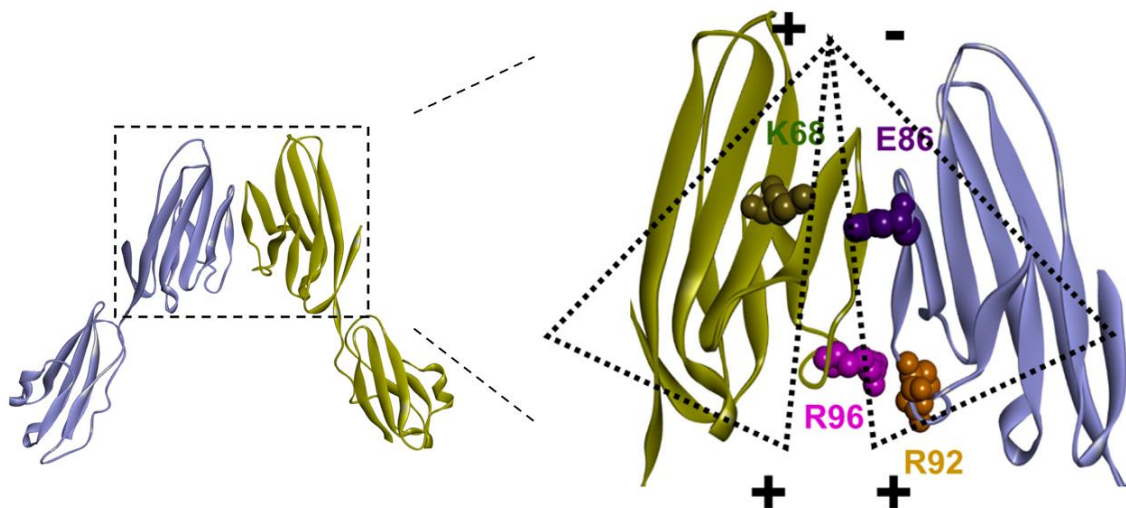


Figura 42. Model de dimerització de la proteïna GlialCAM a través del domini IgV. El dímer és estabilitzat per l'atracció, en la zona superior, que causen la lisina 68 (K68) d'una molècula de GlialCAM amb el glutàmic 86 (E86) de l'altra molècula de GlialCAM i, la repulsió de càrregues, en la zona inferior, que es produeix entre l'arginina 96 (R96) d'una molècula de GlialCAM i l'arginina 92 (R92) de l'altra molècula de GlialCAM.

Aquest model estructural explicaria que els defectes d'homooligomerització que provoquen les mutacions MLC2B són causats per l'efecteció del patró d'interacció que produeixen en la superfície d'interacció cis.

1.4 ESTUDI DELS MUTANTS DE LA PROTEÏNA GLIALCAM LOCALITZATS A LA SUPERFÍCIE D'INTERACCIÓ TRANS.

La proteïna GlialCAM té la capacitat de formar interaccions homofíliques mitjançant interaccions cis (dins la mateixa cèl·lula) i interaccions trans (diferents cèl·lules). Totes dues interaccions són necessàries per l'arribada de GlialCAM a la membrana plasmàtica (Capdevila-Nortes et al., 2015; Hoegg-Beiler et al., 2014).

Resultats previs del laboratori mostraven que les mutacions MLC2B (Q56P, S59N i D128N) no presentaven cap defecte d'interacció amb la proteïna WT, però sí que presentaven defectes en l'arribada a les unions cel·lulars. Analitzant la seqüència primària de GlialCAM vam observar que les mutacions serina 59 asparagina (S59N) i aspàrtic 128 asparagina (D128N) generaven un lloc de N-glicosilació (**figura 43A**). Per confirmar que les mutacions S59N i D128N introduïen una glicosilació, vam tractar els extractes de tots dos mutants amb l'enzim Endo-F (*Endo Glycosidase-F*). Anàlisi per WB dels mutants S59N i D128N, després del tractament amb Endo-F, mostraven la mateixa mobilitat que la proteïna WT, confirmant que totes dues mutacions incorporaven una glicosilació als residus 59 i 128 de la proteïna GlialCAM (**figura 43B**).

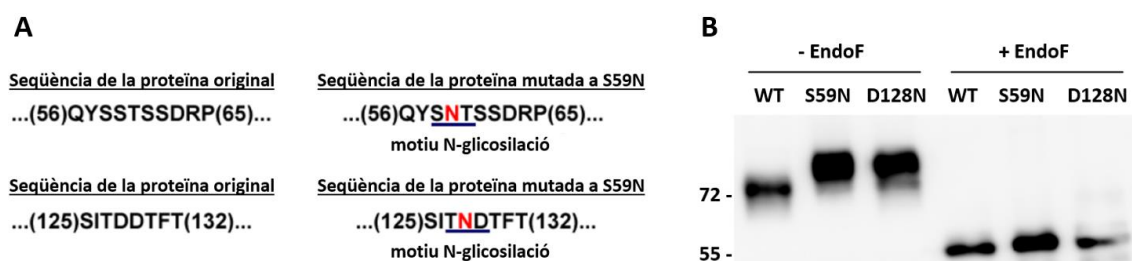


Figura 43. Estudi de les mutacions dominants MLC2B de tipus D2. **A)** Seqüència primària de la proteïna GlialCAM senyalant els motius de N-glicosilació generats per les mutacions S59N i D128N. **B)** WB de cèl·lules HEK 293T transfectades amb la proteïna GlialCAM-3flag i els mutants Q56P, S59N i D128N sense tractar amb Endo-F (esquerra) o tractats amb Endo-F (dreta). Es va utilitzar l'anticòs anti-flag per detectar la proteïna GlialCAM.

Analitzant el model estructural del homodímer de GlialCAM vam observar que les mutacions MLC2B tipus 2 (Q56P, S59N i D128N) es trobaven localitzades en la zona superior del domini IgV, pròximes entre si (**figura 44**). Aquest fet ens va portar a hipotetitzar que les mutacions dominants de GlialCAM de tipus 2 efectuen la superfície d'interacció trans de la proteïna GlialCAM.

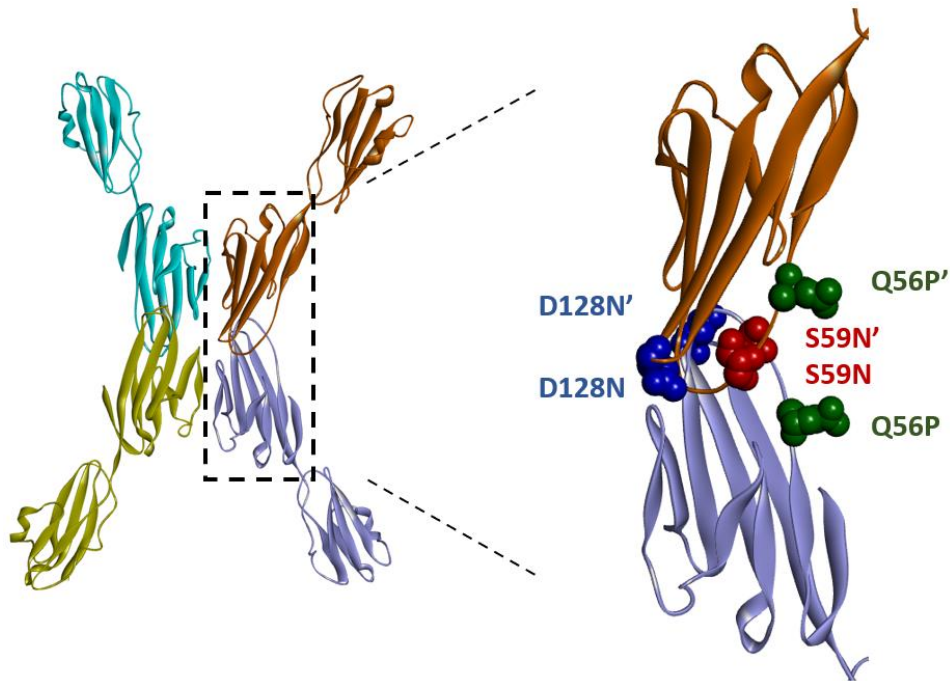


Figura 44. Model de la interacció trans entre dos dimers de la proteïna GlialCAM a través del domini IgV. S'han assenyalat els mutants dominants de tipus 2 de les dues molècules de GlialCAM interaccionant en trans la glutamina 56 a prolina (Q56P, en verd), la serina 59 a asparagina (S59N, en vermell) i l'aspàrtic 128 a asparagina (D128N, en blau).

1.4.1 Generació i caracterització del *nanobody* 139G1 (Nb 139G1) per estudiar la possible superfície d'interacció trans de la proteïna GlialCAM.

Per estudiar quines regions de la proteïna GlialCAM eren importants en les interaccions trans, vam generar *nanobodies* (Nb) contra la regió extracel·lular de GlialCAM a través de l'empresa *Hybrigenic*. L'empresa *Hybrigenic* ofereix una llibreria sintètica de 3×10^9 Nbs els quals son analitzats contra la proteïna d'interès, i mitjançant citometria de flux seleccionen aquells Nbs que donen positiu per la proteïna en estudi. En el nostre cas, vam obtenir el Nb 139G1 contra la proteïna GlialCAM.

El Nb 139G1 va ser produït en bacteris *E. coli* de la soca WK6 (apartat metodologia 2.9) i purificat utilitzant la resina Ni-NTA. Tot seguit, es va realitzar una SEC utilitzant la columna *Superose 6 10/300 GL* de 25 mL per obtenir el Nb 139G1. El perfil de SEC mostra un pic majoritari i simètric al voltant dels 18 mL i amb uns nivells d'absorbància de 200 mAU. Es va realitzar un *coomassie* de comprovació que mostrava una banda per sobre els 15 kDa. Aquesta banda coincidia amb la detectada per WB utilitzant l'anticòs anti-histidines, confirmant que es tractava del Nb 139G1 (**figura 45**).

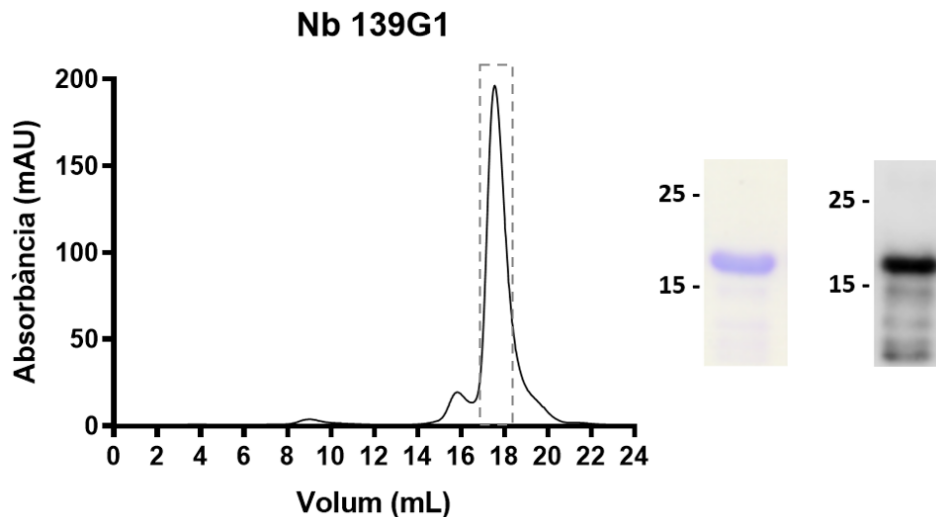


Figura 45. Producció del nanobody (Nb) 139G1. Perfil de SEC després de purificar el Nb 139G1 amb la resina Ni-NTA utilitzant la columna *Superose 6 10/300 GL* a un flux de 0,3 mL/min. A la dreta, es mostra el *coomassie* i el WB del pic recollir de la SEC. El WB del Nb 139G1 va ser revelat amb l'anticòs anti-histidines.

1.4.2 Estudi dels mutants de la proteïna GlialCAM localitzats a la superfície d'interacció trans a través del Nb 139G1.

A continuació, es van utilitzar diferents dosis del Nb 139G1 (0, 5, 25 i 50 µg) contra cèl·lules HEK 293T que expressaven la proteïna GlialCAM-VFP per analitzar si l'unió del d'aquest *nanobody* provocava algun defecte en la localització de GlialCAM a les unions cel·lulars. Com a control negatiu, es va utilitzar un Nb que no interaccionava amb la proteïna GlialCAM (Nb 181) a la màxima dosi (50 µg). Els resultats obtinguts mostraven un defecte de trànsit de l'arribada de GlialCAM a les unions cel·lulars de manera dosi dependent. En canvi, el Nb control (Nb 181) no efecteva l'arribada de GlialCAM-VFP a les unions cel·lulars (**figura 46A**). Aquests resultats indicaven que el Nb 139G1 bloquejava una possible superfície d'interacció trans localitzada en el domini IgV de la proteïna GlialCAM, impedit la localització de GlialCAM a les unions cel·lulars.

Aquest resultats van portar a estudiar a quin domini de la regió extracel·lular de la proteïna GlialCAM s'unia el Nb 139G1. Per realitzar estudis de citometria de flux es va fusionar el Nb 139G1 amb la regió Fc de conill, obtenint el *minibody* 139G1rFc (Mb 139G1rFc), i es van utilitzar els constructes dissenyats pel Dr. Xavi Capdevila-Nortes que expressaven, per una banda, la proteïna GlialCAM sense el domini IgV; i per l'altra, una proteïna GlialCAM sense el domini IgC2 sense efecter la seva expressió a la membrana

plasmàtica (Capdevila-Nortes et al., 2015). Es va utilitzar l'anticòs monoclonal de GlialCAM com a control d'expressió de la proteïna GlialCAM a la membrana plasmàtica.

Els resultats obtinguts per citometria de flux mostraven una reducció parcial de l'unió del Mb 139G1rFc i de l'anticòs monoclonal de GlialCAM amb la proteïna GlialCAM sense el domini IgC2, i una eliminació total de l'unió d'ambdós anticossos amb la proteïna GlialCAM sense el domini IgV (**figura 46B**). Aquests resultats indicaven que el Mb 139G1rFc i l'anticòs monoclonal de GlialCAM s'unien al domini IgV de la proteïna GlialCAM.

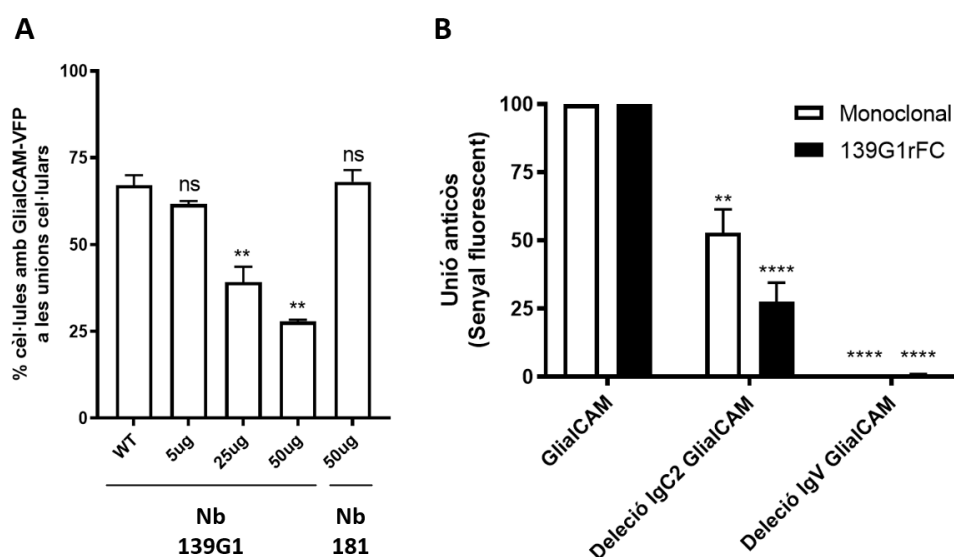


Figura 46. Caracterització del nanobody (Nb) i el minibody (Mb) 139G1 contra la proteïna GlialCAM. **A)** Quantificació de GlialCAM-VFP a les unions cel·lulars expressada en cèl·lules HeLa i tractades amb diferents dosis del Nb 139G1 (5, 25 i 50 µg); Nb 181 va ser utilitzat com a control negatiu. La quantificació del percentatge de cèl·lules amb GlialCAM-VFP sense Nb era 67,1 ± 2,86 % (110 cèl·lules), amb 5 µg del Nb era 67,1 ± 0,84 % (122 cèl·lules), 25 µg era 39,2 ± 4,4 % (117 cèl·lules), 50 µg era 27,8 ± 0,5 % (111 cèl·lules) i 50 µg del Nb control era 68,1 ± 3,4 % (104 cèl·lules). Els gràfics representen la mitjana ± SEM. ** P < 0,01 en el test de comparació múltiple ANOVA Bonferroni contra WT. Resultats de dues transfeccions diferents. **B)** Quantificació del percentatge d'unió de l'anticòs en cèl·lules HEK 293T transfectades amb GlialCAM WT, delecio de IgC2 de GlialCAM i delecio de IgV de GlialCAM utilitzant citometria de flux. El percentatge d'unió de l'anticòs contra la delecio de IgC2 i la delecio de IgV va ser normalitzada amb l'unió de l'anticòs contra GlialCAM. La mitjana del percentatge de l'anticòs monoclonal (blanc) contra la delecio de IgC2 era 52,8 ± 8,6 % (n=4) i contra la delecio de IgV era 0,42 ± 0,07 % (n=4). La mitjana del percentatge del minibody 139G1 (negre) contra la delecio de IgC2 era 27,46 ± 7,1 % (n=4) i contra la delecio de IgV era 0,74 ± 0,3 % (n=4). Els gràfics representen la mitjana ± SEM. ** P < 0,01 i **** P < 0.0001 en el test de comparació múltiple ANOVA Bonferroni contra WT.

Els resultats obtinguts suggerien que l'unió del Nb 139G1 al domini IgV de la proteïna GlialCAM podria estar dificultant les interaccions trans (diferents cèl·lules), afectant la localització de GlialCAM a les unions cel·lulars.

Com es comentava anteriorment, la localització de les mutacions dominants (MLC2B) de tipus 2 (Q56P, S59N i D128N) a la zona superior del domini IgV suggerien que el defecte de trànsit a les unions cel·lulars que mostraven era degut a una afectació de la superfície d'interacció trans. Per confirmar aquesta hipòtesi, vam analitzar per citometria de flux l'unió del Nb 139G1 amb les mutacions recessives (R92Q i R98C) i les mutacions dominants (G89D/S, R92W, Q56P, S59N i D128N) de GlialCAM localitzades en el domini IgV.

Els mutants G89D i R98C provocaven una disminució d'unió del Nb respecte la proteïna WT; a diferència dels mutants R92Q i R92W que augmentaven l'unió amb el Nb. El mutant Q56P mostrava una eliminació total de l'unió amb el Nb (**figura 47**).

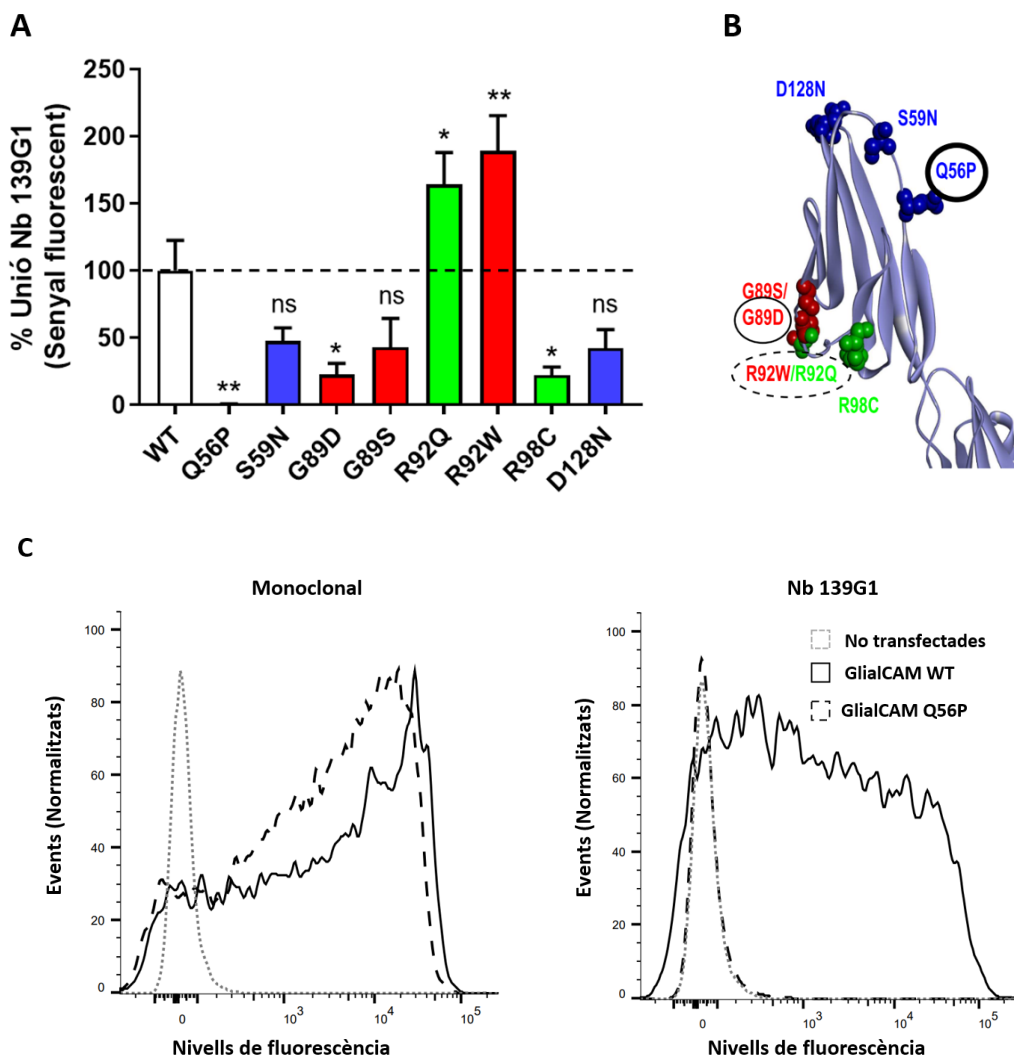


Figura 47. Caracterització del minibody (Mb) 139G1. A) Quantificació de l'unió del minibody (Mb) 139G1rFc per citometria de flux en cèl·lules HEK 293T transfectades amb diferents mutants del domini IgV de GlialCAM. Tota la senyal del Mb dels diferents mutants del domini IgV de GlialCAM va ser dividida per la senyal de l'anticòs monoclonal i normalitzada amb l'unió del Mb 139G1rFc contra GlialCAM WT. La mitjana del percentatge de l'unió de l'anticòs de

cada mutant era: p.Q56P era $0,7 \pm 0,4$ % (n=5), p.S59N era $4,7 \pm 9,9$ % (n=5), p.G89D era $22,9 \pm 8,1$ % (n=4), p.G89S era $43,1 \pm 21,4$ % (n=4), p.R92Q era $176,3 \pm 23,9$ % (n=4), p.R92W era $189,3 \pm 26,3$ % (n=4), p.R98C era $17,1 \pm 4,5$ % (n=3) i p.128N era $42,3 \pm 13,8$ % (n=5). Els gràfics representen la mitjana \pm SEM. ns = no significatiu; * $P < 0,05$ i ** $P < 0,01$ en el test de comparació múltiple ANOVA Bonferroni contra WT. **B)** Model bioinformàtic del domini IgV de la proteïna GlialCAM amb la posició de les mutacions MLC2 ressaltades. **C)** Representació dels experiments de citometria de flux mostrant l'unió de l'anticòs monoclonal (esquerre) i el Mb 139G1rFc (dreta) en cèl·lules HEK 293T no transfectades i cèl·lules HEK 293T transfectades amb GlialCAM WT i el mutant p.Q56P.

Els mutants dominants tipus 2, que no mostren cap defecte d'homooligomerització, probablement afecten específicament la superfície d'interacció trans. En el cas de les mutacions S59N i D128N, la creació d'un lloc de glicosilació dins la superfície d'interacció trans podria estar afectant el contacte amb les molècules de GlialCAM de cèl·lules oposades. Per altra banda, els resultats de citometria, obtinguts amb el mutant Q56P, indiquen que probablement altera la superfície d'interacció trans a causa de la manca de rotació que permet la prolina.

El model estructural permetria explicar les diferències bioquímiques observades en les mutacions dominants (MLC2B) identificades en pacients MLC. Com s'observa en altres molècules IgCAM (Kamiguchi & Lemmon, 2000; Matthäus et al., 2017), possiblement els dímers de GlialCAM es formen en el reticle endoplasmàtic a través de les interaccions cis, i tot seguit viatgen cap a la membrana plasmàtica on es donarien les interaccions trans. Aquest model estructural permet observar que els dos tipus de mutacions dominants (MLC2B) estarien afectant a superfícies d'interacció diferents. Les mutacions D1 estarien localitzades a la superfície d'interacció cis (mateixa cèl·lula), afectant la homooligomerització entre dues molècules de GlialCAM, i per tant, la seva localització a les unions cel·lulars. En canvi, les mutacions D2 estarien localitzades a la superfície d'interacció trans (diferents cèl·lules), permetent la correcta homooligomerització entre dues molècules de GlialCAM de la mateixa cèl·lula, però afectant la interacció entre els dímers de GlialCAM de diferents cèl·lules, impeding d'aquesta manera la seva localització a les unions cel·lulars (**figura 48**).

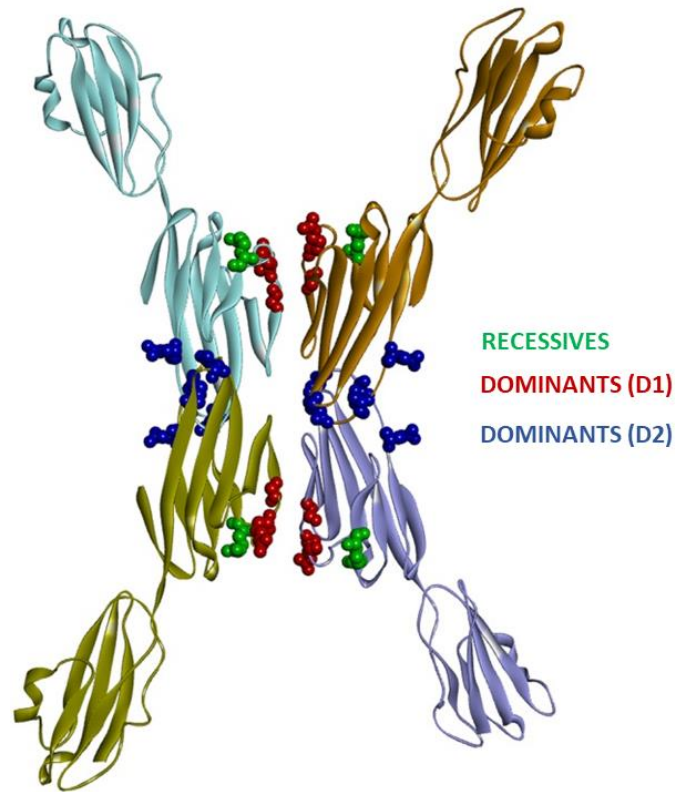


Figura 48. Model estructural de les possibles superfícies d'interacció cis i trans entre molècules de GlialCAM a través del domini IgV. S'han assenyalat en verd les mutacions recessives (MLC2A) arginina 98 cisteïna (R98C), en vermell les mutacions dominants (MLC2B) tipus 1 glicina 89 serina o aspàrtic (G89S/D), arginina 92 triptòfan (R92W) i en blau les mutacions dominants (MLC2B) tipus 2 glutamina 56 prolina (Q56P), serina 59 asparagina (S59N) i aspàrtic 128 asparagina (D128N).

**2.BASES MOLECULARS DELS MUTANTS DE LA
PROTEÏNA GlialCAM LOCALITZATS EN EL
DOMINI IgC2.**

Estudis estructurals recents mostren la capacitat de les molècules d'adhesió de formar estructures en forma de cremallera (en anglès *zipper structures*) (Aricescu & Jones, 2007), les quals podrien servir com a plataformes d'organització per a complexes de senyalització o formar punts d'ancoratge amb components del citoesquelet (Dong et al., 2006). Estudis de cristal·lització de la IgCAM axonin-1 suggereixen que les estructures en forma de cremallera es donen a través d'interaccions homofíliques entre molècules axonin-1 de diferents cèl·lules, requerint d'interaccions addicionals cis i trans (Freigang et al., 2000).

Aquests estudis coincideixen amb la capacitat de la proteïna GlialCAM de formar interaccions homofíliques i heterofíliques a través d'interaccions cis i interaccions trans (Capdevila-Nortes et al., 2015; Elorza-Vidal et al., 2020; López-Hernández, Sirisi, et al., 2011; Moh et al., 2005). A més, la proteïna GlialCAM té la capacitat de concentrar-se a les unions cel·lulars i de canviar la localització de les proteïnes MLC1 (Capdevila-Nortes et al., 2013) i CIC-2 (Jeworutzki et al., 2012) a les unions cel·lulars. Aquests resultats ens van portar a hipotetitzar que possiblement els dímers de GlialCAM podrien estar formant estructures en forma de cremallera a través del domini IgC2.

Les mutacions recessives serina 196 a tirosina (S196Y) i aspàrtic 211 a asparagina (D211N) eren les úniques mutacions identificades en pacients MLC que es localitzaven en el domini IgC2 de la proteïna GlialCAM. Mitjançant el model estructural generat del homodímer de GlialCAM, vam observar ambdues mutacions es localitzaven en estructures hèlix α . Estudis previs del laboratori, realitzats en astròcits *knockout* per MLC1, mostraven que les mutacions recessives de GlialCAM p.S196Y i p.D211N tenien la capacitat d'arribar a la membrana plasmàtica, però no s'internalitzaven amb la presència de potassi, a diferència de la proteïna GlialCAM WT (Arnedo T., et al., 2014). Aquests resultats suggerien que les mutacions recessives p.S196Y i p.D211N provocaven un augment d'estabilitat en l'estructura en forma de cremallera formada pels diferents dímers de GlialCAM que impedièen la internalització de la proteïna.

Degut a la localització dels mutants S196Y i D211N a les hèlix α , les quals són estructures típiques d'interacció entre proteïnes (Azzarito et al., 2013), i la bona disposició que mostraven per interaccionar, vam analitzar la possibilitat que les dues hèlix α

localitzades en el domini IgC2 d'una molècula de GlialCAM interaccionessin amb les hèlix α d'un altra molècula de GlialCAM. Per tant, conjuntament amb el doctorand Adrià Pla Castellanis, vam mutar a cisteïnes tots els residus que composaven les dues hèlix α (hèlix α 1: S191C, R192C, M193C, L194C, L195C i S196C; hèlix α 2: M209C, E210C i D211C), i vam analitzar per WB la formació de *cross-links* a través de ponts disulfurs (**figura 49**).

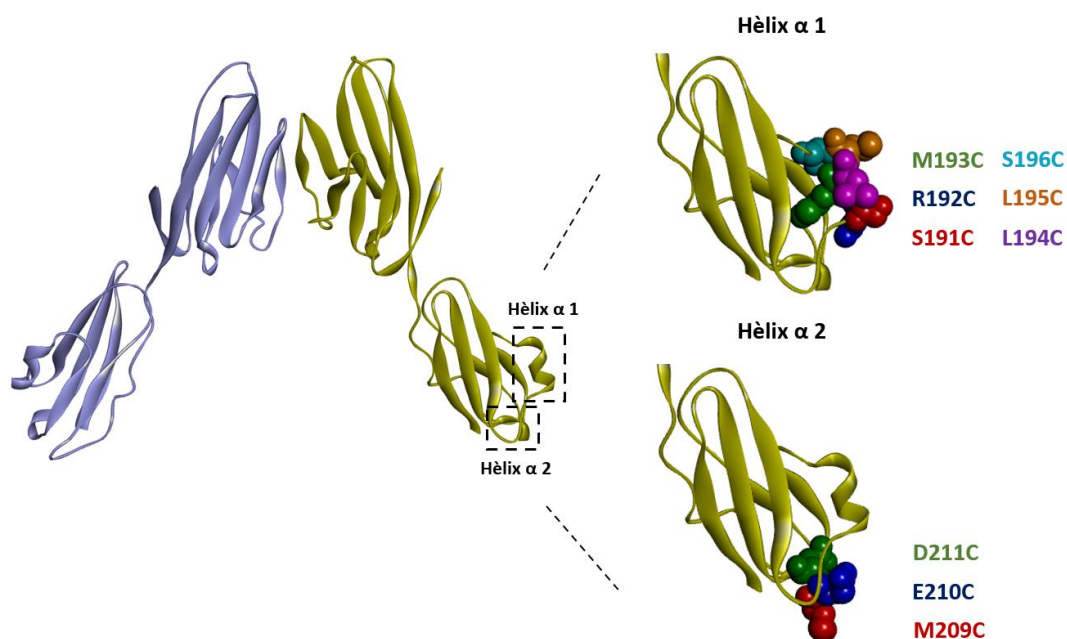


Figura 49. Model bioinformàtic de l'homodímer de GlialCAM indicant els mutants a cisteïnes dels residus localitzats en les dues hèlix α del domini IgC2. Els mutants generats a l'hèlix α 1 són la serina 191 a cisteïna (S191C en vermell), l'arginina 192 a cisteïna (R192C en blau), la metionina 193 a cisteïna (M193C en verd), la leucina 194 a cisteïna (L194C en lila), la leucina 195 a cisteïna (L195C em taronja) i la serina 196 a cisteïna (S196C en turquesa). Els mutants generats a la hèlix α són la metionina 209 a cisteïna (M209C en vermell), el glutàmic 210 a cisteïna (E210C) i l'aspàrtic 211 a cisteïna (D211C en verd).

Les anàlisis per WB, sense la presència d'un agent reductor (- DTT), mostraven la formació de dímers en els mutants S191C i R192C de l'hèlix α 1, i en els mutants E210C i D211C de l'hèlix α 2 (banda al voltant de 150 kDa). Per confirmar que els dímers eren deguts als ponts disulfurs formats per les cisteïnes, es va realitzar un WB amb la presència d'un agent reductor (+ DTT) el qual mostrava la desaparició de la banda de 150 kDa i un augment de la intensitat de la banda de 72 kDa. Es va utilitzar la proteïna GlialCAM WT com a control negatiu i el mutant E86C com a control positiu. L'actina es va utilitzar com a control de càrrega (**figura 50A**).

Tot seguit, es va analitzar l'arribada a unions cel·lulars dels mutants de cisteïnes que mostraven la formació de dímers per WB (S191C, R192C, E210C i D211C). Els estudis d'immunocitoquímica mostraven un augment de l'arribada a unions cel·lulars del mutant S191C comparat amb la proteïna WT. Els altres mutants (R192C, E210C i D211C) no mostraven diferències significatives de l'arribada a unions cel·lulars en comparació amb la proteïna WT (**figura 50B**).

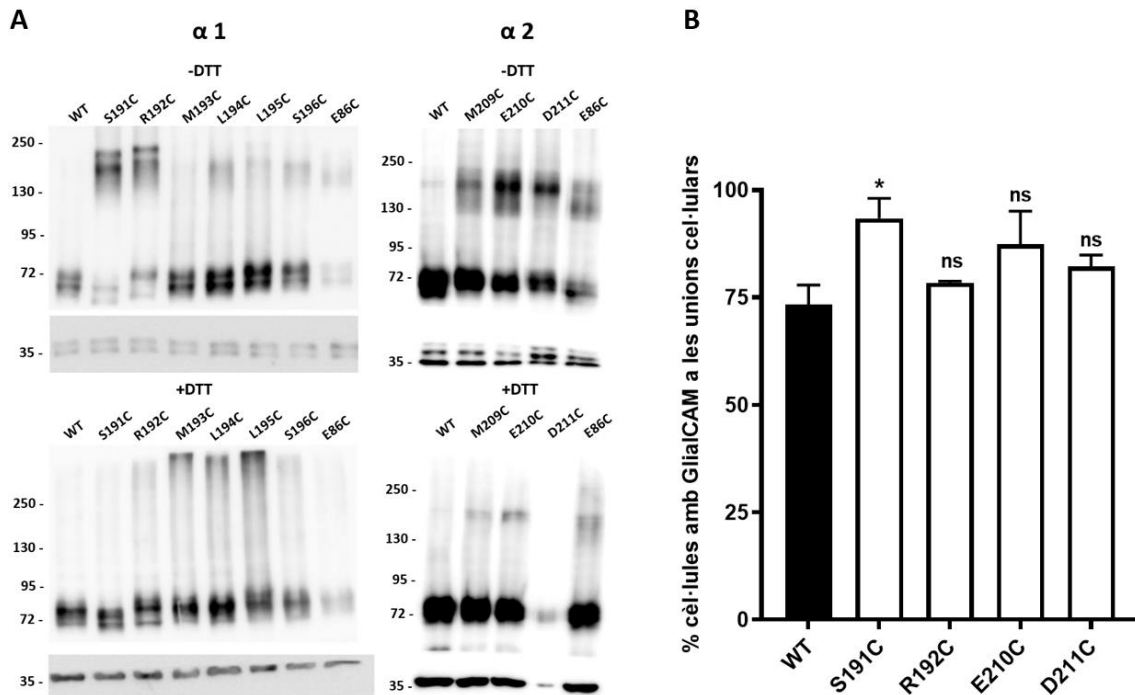


Figura 50. Estudi dels mutants a cisteïnes dels residus de les dues hèlix α del domini IgC2 de la proteïna GlialCAM. **A)** WB dels cross-links en absència i presència de 100 mM de DTT dels residus mutats a cisteïnes de la hèlix α 1: S191C, R192C, M193C, L194C, L195C i S196C i de la hèlix α 2. M209C, E210C i D211C. GlialCAM WT és utilitzat com a control negatiu i E86C com a control positiu. Els dímers són observats en els mutants S191C, R192C, E210C i D211C. Western blot representatiu de tres experiments diferents. **(B)** Quantificació del percentatge a les unions cel·lulars de S191C (171 cèl·lules), R192C (162 cèl·lules), E210C (194 cèl·lules) i D211C (248 cèl·lules) comparats amb GlialCAM WT (265 cèl·lules). El gràfic representa la mitjana ± SEM. Test de comparació múltiple ANOVA Bonferroni de tres experiments diferents.

Aquests resultats indicaven que les dues hèlix α del domini IgC2 podrien ser zones d'interacció entre els homodímers de GlialCAM. A més, els resultats obtinguts per immunocitoquímica del mutant S191C suggerien la formació d'un estat oligomèric més estable de GlialCAM que afavoria la seva localització a les unions cel·lulars.

2.1 ESTUDI PER CROMATOGRAFIA D'EXCLUSIÓ PER MIDA (de l'anglès *Size Exclusion Chromatography*, SEC) DEL MUTANT SERINA 191 CISTEÏNA (S191C).

Amb l'objectiu d'analitzar si realment es produïa un augment d'estabilitat entre els homodímers de GlialCAM, vam analitzar per SEC si el mutant S191C presentava el mateix perfil d'oligomerització que la proteïna WT.

Es van realitzar dues expressions d'un litre de cultiu de cadascuna de la proteïna GlialCAM-3flag i el mutant de GlialCAM-3flag S191C en cèl·lules en suspensió HEK293 6E. Tot seguit, es van realitzar dues purificacions paral·leles utilitzant la resina flag i finalment es va dur a terme la SEC de totes dues proteïnes utilitzant la columna *Superdex 200 Increase 10/300 GL* a un flux de 0,3 mL/min.

El perfil de SEC de la proteïna GlialCAM-3flag mostrava uns nivells d'absorbància del pic 1 (10 mL) menor que els observats en el pic 2 (11 mL), 6 mAU i 15 mAU, respectivament (**figura 51A**). En canvi, el perfil de SEC de la proteïna GlialCAM S191C-3flag mostrava uns nivells d'absorbància del pic 1 (10 mL) majors que els observats en el pic 2 (11 mL), 7 mAU i 3 mAU, respectivament (**figura 51B**).

Es va realitzar una tinció de plata del *void volume* i dels pics 1 i 2 senyalats en els perfils de SEC tan de la proteïna GlialCAM-3flag com de la proteïna GlialCAM S191C 3flag. La tinció de plata dels pics corresponents a la purificació de GlialCAM-3flag mostrava una banda al voltant dels 72 kDa, tant quan la mostra era tractada amb un agent reductor (β -mercaptoetanol) com la no tractada (**figura 51A**). En canvi, la tinció de plata dels pics corresponents a la purificació de GlialCAM S191C 3flag mostrava una banda al voltant dels 250 kDa quan la mostra no era tractada amb un agent reductor (β -mercaptoetanol), i quan era tractada amb β -mercaptoetanol mostrava una banda al voltant dels 72 kDa (**figura 51B**).

Per altra banda, anàlisi per espectrometria de masses de la banda observada en la tinció de plata corresponent al pic 2 de la proteïna WT confirmaven que la proteïna majoritària era GlialCAM.

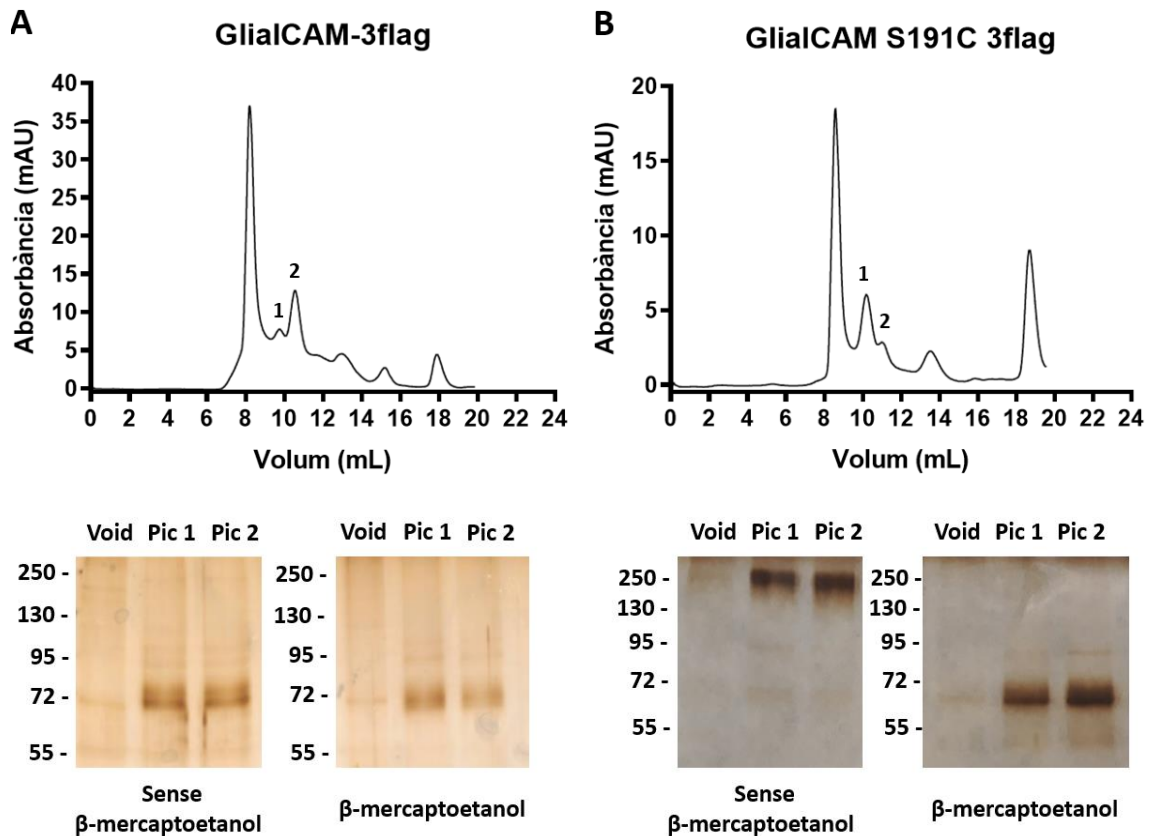


Figura 51. Comparació de la purificació de la proteïna GlialCAM-3flag contra el mutant GlialCAM S191C-3flag. Perfils de SEC senyalant el pic 1 (10 mL) i el pic 2 (11 mL) després de purificar la proteïna GlialCAM-3flag (**A**) o la proteïna GlialCAM S191C-3flag (**B**). En tots dos casos es va realitzar la tinció de plata del *void volume* i els pics 1 i 2 tractats i sense tractar amb un agent reductor (β -mercaptoetanol). Les dues purificacions es van realitzar amb DM al 1% i CHS al 0,2% utilitzant la resina Flag i es va utilitzar la columna Superdex 200 Increase 10/300 GL de 25 mL, la mostra va córrer a un flux de 0,3mL/min.

L'augment d'absorbància del pic 1 respecte el pic 2 que es produeix en el mutant GlialCAM S191C 3flag respecte la proteïna WT mostraven que el mutant S191C tendia a formar un estat oligomèric major que la proteïna GlialCAM WT. Per altra banda, els resultats obtinguts per tinció de plata indicaven que l'augment de pes observat en el mutant S191C era degut a la formació d'un *cross-link* a través de la formació d'un pont disulfur. Aquests resultats reforçaven la hipòtesi inicial que suggeria una possible interacció cis de la proteïna GlialCAM que permetria la formació d'estructures en forma de cremallera a través de les hèlix α localitzades en el domini IgC2.

2.2 MODEL BIOINFORMÀTIC DELS HOMODÍMERS DE GlialCAM INTERACCIANT EN CIS A TRAVÉS DEL DOMINI IgC2.

Igual que en el capítol anterior, el Dr. Juan Fernández Recio va dissenyar un model bioinformàtic que permetia observar la possible conformació dels diferents homodímers de GlialCAM interaccionant entre si en cis (en la mateixa cèl·lula) a través del domini IgC2. Aquest model, basat en el modelatge per *docking* i imposant les restriccions experimentals observades amb els mutants de cisteïnes, mostrava la possible estructura en forma de cremallera que formaven els homodímers de GlialCAM (figura 52).

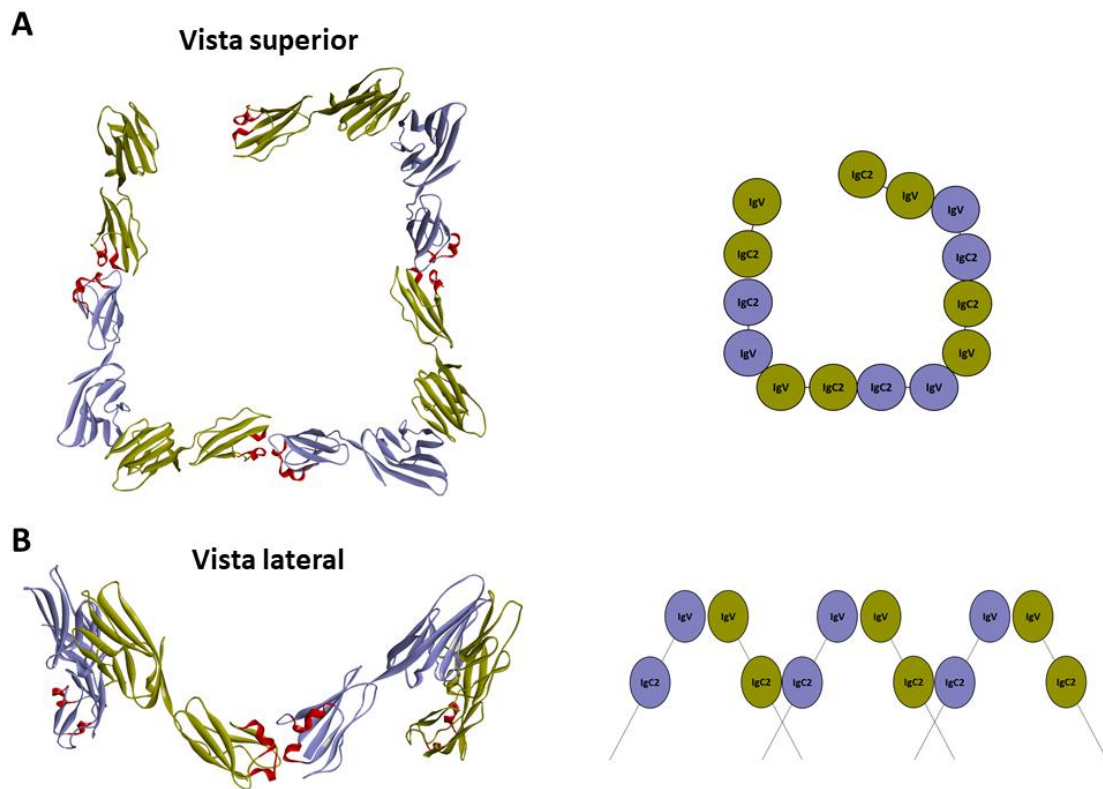


Figura 52. Representació del model bioinformàtic de la possible xarxa que formen les proteïnes GlialCAM en una mateixa cèl·lula. Varies molècules de GlialCAM (acolorides en lila i verd) interaccionant en cis a través de les dues hèlix α (acolorit en vermell) localitzades en el domini IgC2, i a través del domini IgV. **A)** Vista superior amb representació esquemàtica a l'esquerra. **B)** Vista lateral amb representació esquemàtica a l'esquerra.

Per tant, els resultats obtinguts del mutant S191C confirmaven la hipòtesi inicial que suggeria que el defecte d'internalització en condicions despolaritzants que causaven les mutacions p.S196Y i p.D211N (Arnedo T., et al., 2014) era degut a un augment de la força d'interacció entre els homodímers de GlialCAM. Aquest augment d'estabilitat podria estar dificultant la disgregació entre els homodímers de GlialCAM davant d'un estímul, com el potassi, evitant la seva internalització, i d'aquesta manera, efecter la possible senyalització amb altres proteïnes.

3.RESOLUCIÓ DE L'ESTRUCTURA DEL COMPLEX MLC1/GliaICAM.

El coneixement de l'estructura tridimensional (3D) de les proteïnes permet observar en detall les macromolècules, ajudant a entendre les seves funcions biològiques (Bai et al., 2015); i facilitant el disseny de fàrmacs, permetent una opció terapèutica (Suades et al., 2019).

Actualment, es desconeix la funció exacte que realitzen les proteïnes responsables de MLC (MLC1 i GlialCAM). Aquest capítol s'ha centrat en la resolució de l'estructura tridimensional d'ambdues proteïnes interaccionant entre si, amb l'objectiu d'augmentar el coneixement sobre la patologia de MLC i poder entendre el paper d'ambdues proteïnes en la regulació de l'homeòstasi iònica i el flux d'aigua que diversos resultats indiquen que estan implicades.

3.1 DISSENY DEL CONSTRUCTE PER PURIFICAR LA PROTEÏNA MLC1 HUMANA.

Per dur a terme la purificació d'una proteïna, s'ha d'incorporar un *tag* que permeti la seva purificació sense efecter la seva conformació fisiològica. Per tant, el primer objectiu va ser dissenyar i analitzar diferents constructes que incorporessin un *tag* el qual ens permetés purificar la proteïna MLC1 humana (hMLC1) sense efecter la seva conformació fisiològica.

Els constructes dissenyats van ser els següents:

1. El constructe **hMLC1-3C-GFP-10His** que incorporava la seqüència de reconeixement de la proteasa 3C (LEVLFQGP) per poder alliberar tan la GFP com les 10 histidines, una GFP per poder fer el seguiment de la proteïna per fluorescència, i un *tag* de 10 histidines per purificar utilitzant la resina de Ni-NTA. Tots els *tags* estaven incorporats a l'extrem C-terminal de la proteïna MLC1, ja que estudis previs del laboratori mostraven que l'addició d'un *tag* gran, com la GFP, a l'extrem N-terminal provocava la degradació de la proteïna.
2. El constructe **9His-3C-hMLC1** que incorporava un *tag* de 9 histidines a l'extrem N-terminal de la proteïna MLC1 seguit de la seqüència de reconeixement de la proteasa

3C (LEVLFGQP). La seqüència 3C ens permetia eluir la proteïna, i al mateix temps, alliberar-la del *tag* d'histidines.

3. El constructe **TwinStrep-hMLC1** que incorporava un doble *tag* strep (MAS **WSHPQFEK** GGGS GGGS GGGSS **WSHPQFEK** SSG) a l'extrem N-terminal de la proteïna MLC1.
4. El constructe **Strep-9His-hMLC1** que incorporava un *tag* Strep (WSHPQFEK) seguit d'un *tag* de 9 histidines a l'extrem N-terminal de MLC1.

Una vegada dissenyat els diferents constructes, vam analitzar els nivells d'expressió dels quatre constructes per WB, utilitzant l'anticòs N4 humà (**figura 53**). Tots 4 constructes mostraven uns correctes nivells d'expressió comparat amb la proteïna hMLC1 sense cap *tag*. Com a control negatiu, es va utilitzar cèl·lules no transfectades per comprovar la inespecificitat de l'anticòs N4 humà.

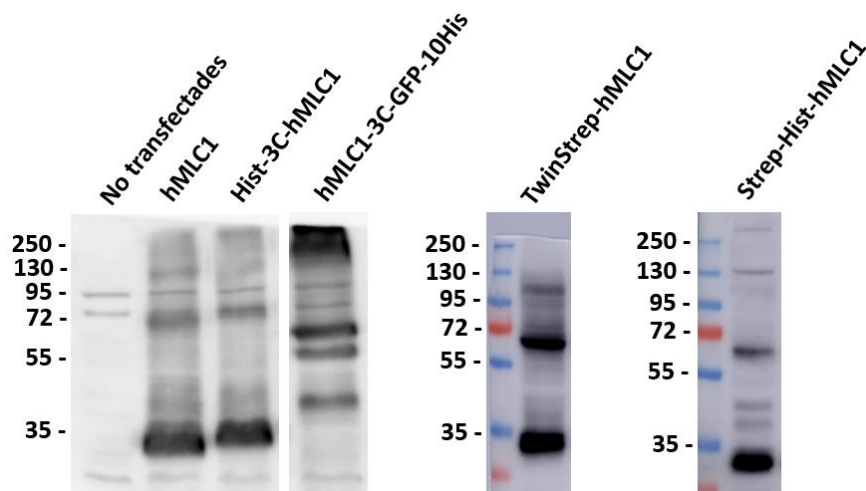


Figura 53. WB dels diferents constructes dissenyats per purificar la proteïna MLC1. WB de la proteïna 9His-3C-hMLC1, TwinStrep-hMLC1 i Strep-His-hMLC1. Com a control negatiu s'ha utilitzat cèl·lules HEK 293T no transfectades i com a control positiu s'ha utilitzat la proteïna MLC1 humana (hMLC1). La proteïna MLC1 s'ha detectat utilitzant l'anticòs N4 humà. El pes molecular dels diferents constructes és l'esperat degut a l'addició dels diferents *tags*.

3.1.1 Selecció del detergent per purificar la proteïna MLC1.

Per poder purificar les proteïnes de membrana, un dels passos més importants és l'extracció de la membrana plasmàtica utilitzant detergents que permetin la formació

de micel·les on es diposita la proteïna d'estudi sense que s'alteri la seva conformació fisiològica (Matar-Merheb et al., 2011).

Els detergents són molècules amfipàtiques composades per un cap polar i una cadena hidrofòbica. Generalment, en solucions aquoses formen espontàniament micel·les on les proteïnes de membrana són solubles. Per tant, els detergents s'utilitzen per solubilitzar les proteïnes de membrana, ja que mimetitzen la naturalesa lipídica de la membrana plasmàtica on es localitzen les proteïnes de membrana (Seddon et al., 2004).

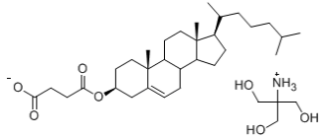
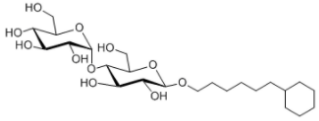
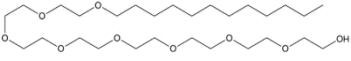
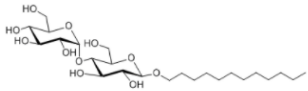
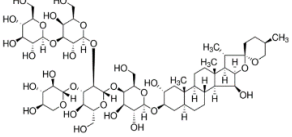
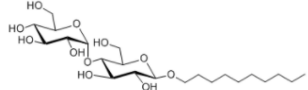
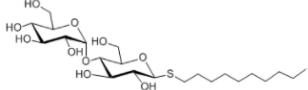
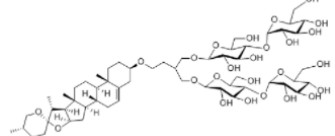
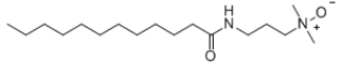
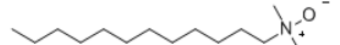
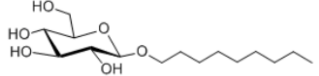
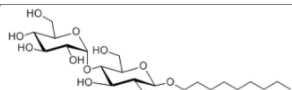
Per poder analitzar si els constructes dissenyats podien ser purificats, primer havíem de seleccionar quin detergent era el més adient per purificar la proteïna MLC1. L'avaluació dels diferents detergents es va dur a terme mitjançant la tècnica FSEC (de l'anglès *Fluorescence Size Exclusion Chromatography*).

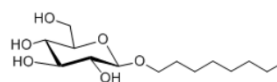
La FSEC és una tècnica utilitzada per analitzar ràpidament varies condicions en la proteïna d'interès. La tècnica consisteix en la detecció únicament d'una proteïna fluorescent, normalment GFP (de l'anglès *Green Fluorescent Protein*), que està fusionada a la proteïna d'interès. D'aquesta manera, proporciona un perfil de SEC que permet analitzar l'estat d'agregació o el comportament de la proteïna en diverses condicions sense la necessitat de purificar-la (Kawate & Gouaux, 2006).

En el nostre cas, vam utilitzar el constructe hMLC1-3C-GFP-10His, ja que incorporava una GFP a l'extrem C-terminal de MLC1. Aquest constructe va ser expressat en cèl·lules en suspensió HEK293 6E i va ser solubilitzat durant 1 hora utilitzant 1% del detergent i 0,2% de CHS, excepte la digitonina que no portava CHS.

El colesterol o un anàleg, com per exemple el CHS (de l'anglès *Cholesteryl Hemisuccinate tris Salt*) es incorporat en el detergent utilitzat durant la solubilització, ja que acostuma a augmentar l'estabilitat de les proteïnes de membrana i en alguns casos manté la seva funció un cop solubilitzades; com és el cas dels receptors acoblats a proteïna G que en general necessiten colesterol per mantenir el seu plegament actiu durant la purificació (Grisshammer, 2009). En el cas de la digitonina, no s'afegeix CHS ja que és un detergent que s'associa fortament amb components de la membrana, especialment al colesterol (Korchowiec et al., 2021).

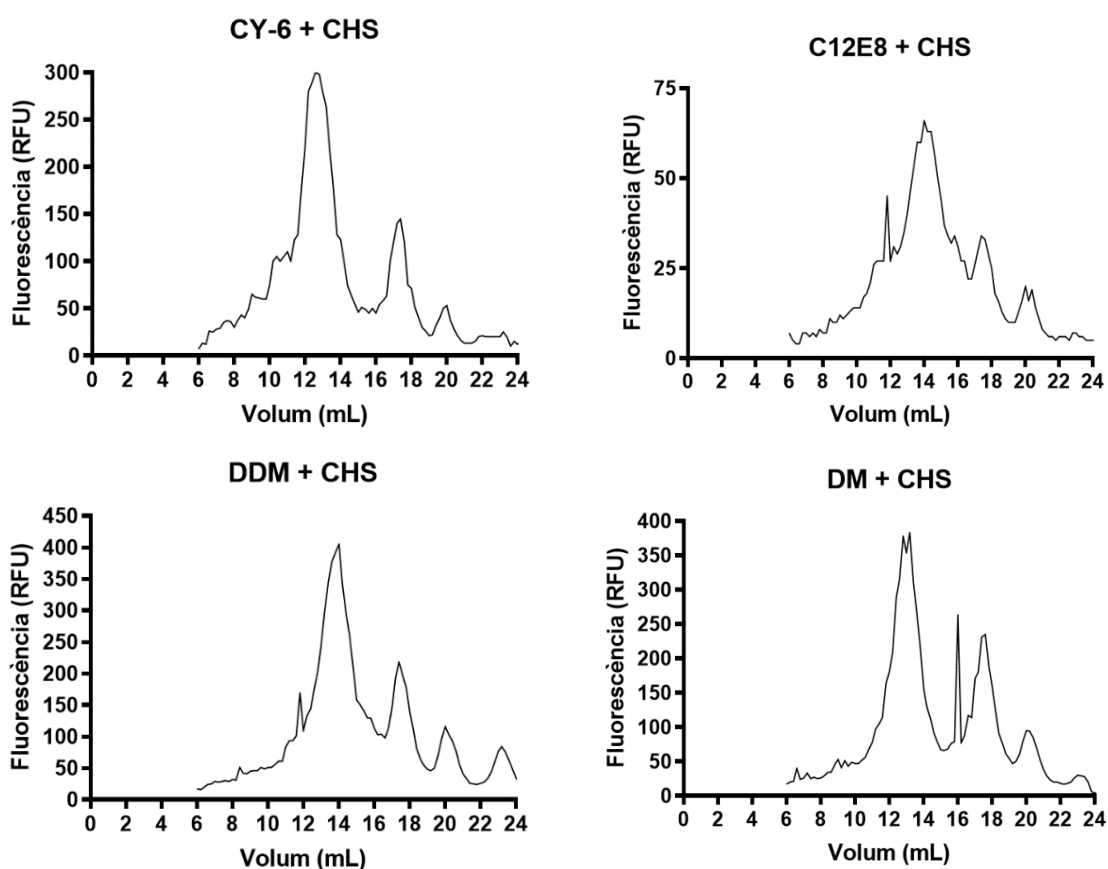
Per realitzar les FSECs es va utilitzar la columna *Superose 6 10/300 GL* de 25 mL per realitzar la SEC, i amb un fluorímetre es va obtenir la fluorescència de la GFP que incorporava la proteïna MLC1, obtenint els diferents perfils de FSECs. La **taula 7** mostra els detergents utilitzats.

ABREVIACIÓ	NOM COMPLET	FORMULA	ESTRUCTURA QUÍMICA
CHS	Colesterol Hemisuccinat Tris Salt	$C_{31}H_{50}O_4 \cdot C_4H_{11}NO_3$	
CY-6	Cymal-6	$C_{24}H_{44}O_{11}$	
C12E8	Octaetilè glicol monododecil-éter	$C_{28}H_{58}O_9$	
DDM	n-Dodecil-β-D- Maltopiranòsid	$C_{24}H_{46}O_{11}$	
Digitonina	Digitonina	$C_{56}H_{92}O_{29}$	
DM	n-Decil-β-D- Maltopiranòsid	$C_{22}H_{42}O_{11}$	
DM thiol	n-Decil-β-D- Thiomaltopiranòsid	$C_{22}H_{42}O_{10}S$	
GDN	Glico-diosgenin	$C_{56}H_{92}O_{25}$	
LAPAO	3-Laurilamina-N,N'- Dimetilpropil Amina Òxid	$C_{17}H_{36}N_2O_2$	
LDAO	n-Dodecil-N,N- Dimetilamina-N-Òxid	$C_{14}H_{31}NO$	
Nonylglucoside	n-Nonil-β-D- Glucopiranòsid	$C_{15}H_{30}O_6$	
Nonylmaltoside	n-Nonil-β-D- Maltopiranòsid	$C_{21}H_{40}O_{11}$	

Octylglucosiden-Octil- β -D-
Glucopiranosid $C_{14}H_{28}O_6$ 

Taula 7. Detergents utilitzats indicant el seu nom complet, la fórmula molecular i la seva estructura química.

Els perfils de FSECs utilitzant els detergents: CY-6, DDM, DM, DM Thiol i LDAO (tots amb CHS) i la digitonina, mostraven un pic majoritari simètric entre els 10 i 12 mL, i uns nivells de fluorescència al voltant de 300-400 RFUs (*Relative Fluorescence Units*). Els perfils de FSEC utilitzant els detergents nonylmaltoside i LAPAO (ambdós amb CHS) mostraven un pic majoritari simètric al voltant dels 12-14 mL amb uns nivells de fluorescència al voltant dels 200 RFU. Els perfils de FSEC utilitzant els detergents octilglucòsid i nonilglucòsid (ambdós amb CHS) mostraven un pic majoritari ample entre els 8 i 13 mL amb uns nivells de fluorescència màxima de 225 RFU. El perfil de FSEC utilitzant el detergent C12E8 amb CHS mostrava un pic majoritari ample entre els 12 i 16 mL amb uns nivells de fluorescència màxima de 70 RFU (**figura 54**).



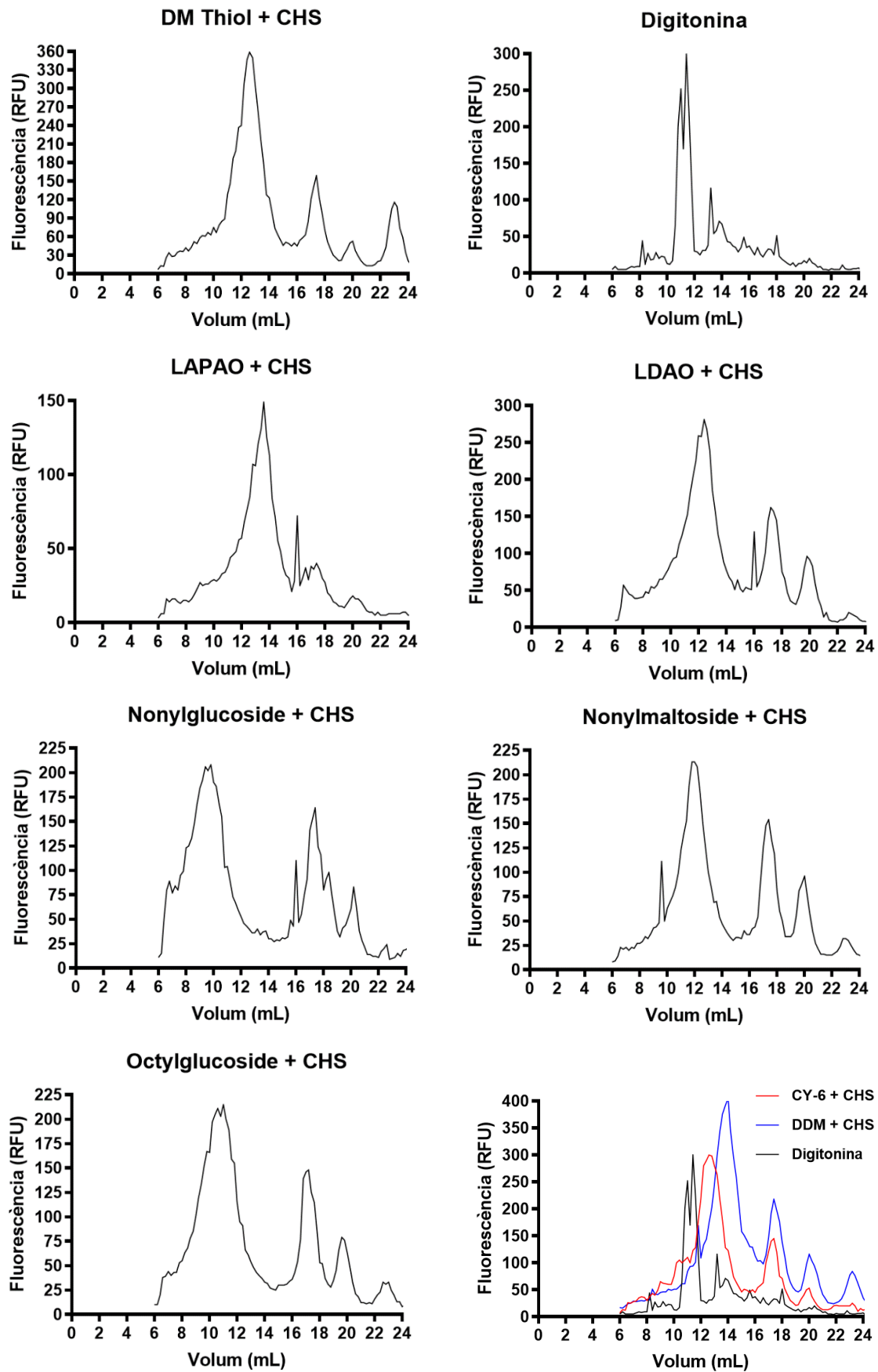


Figura 54. Perfils de FSEC dels diferents detergents utilitzats per solubilitzar la proteïna hMLC1-3C-GFP-10His. El constructe hMLC1-3C-GFP-10His va ser expressat en cèl·lules HEK 293 6E en suspensió i solubilitzat 1 hora amb els diferents detergents a l'1%. Es va utilitzar la columna *Superose 6 10/300 GL* de 25 mL a un flux de 0,4 mL/min.

A partir dels resultats obtinguts amb les FSECs, vam seleccionar els detergents DDM, el CY-6 (ambdós amb CHS) i la digitonina, ja que eren els detergents que presentaven majors nivells de fluorescència i un pic més simètric.

Un cop seleccionat els detergents, vam comprovar si els *tags* incorporats en els quatre constructes dissenyats eren capaços de purificar la proteïna MLC1.

Vam realitzar quatre expressions a petita escala, utilitzant cèl·lules adherents HEK 293T, dels quatre constructes dissenyats anteriorment (hMLC1-3C-GFP-10His, 9His-3C-hMLC1, Strep-9His-hMLC1 i TwinStrep-hMLC1). Tot seguit, vam fer quatre purificacions paral·leles utilitzant la resina Ni-NTA, en el cas de la proteïna hMLC1-3C-GFP-10His, la proteïna 9His-3C-hMLC1 i la proteïna Strep-9His-hMLC1; i la resina Strep-Tactin en el cas de la proteïna TwinStrep-hMLC1. Per dur a terme les proves de purificació, es va utilitzar el detergent DDM amb CHS, ja que els resultats obtinguts per FSEC mostren un perfil correcte, és un dels detergents més utilitzats per purificar proteïnes de membrana, és un detergent no-iònic que són considerats suaus i no desnaturalitzant perquè afecten poc les interaccions entre lípids i entre lípids-proteïna, i per últim, perquè és un detergent econòmic.

Anàlisis per WB del procés de purificació mostraven que les proteïnes 9His-3C-hMLC1, Strep-9His-hMLC1 i TwinStrep-hMLC1 es purificaven correctament, ja que s'observava marcatge de la proteïna hMLC1 en la proteïna total, la solubilitzada i en l'elució (**figura 55A,C i D**, respectivament). En canvi, els anàlisis per fluorescència del procés de purificació de la proteïna hMLC1-3C-GFP-10His mostraven que no es purificava correctament, ja que la major part de la proteïna la detectàvem en la fracció de no unió a la resina, obtenint uns nivells de hMLC1 en la elució inferiors al 10% de la proteïna total (**figura 55B**).

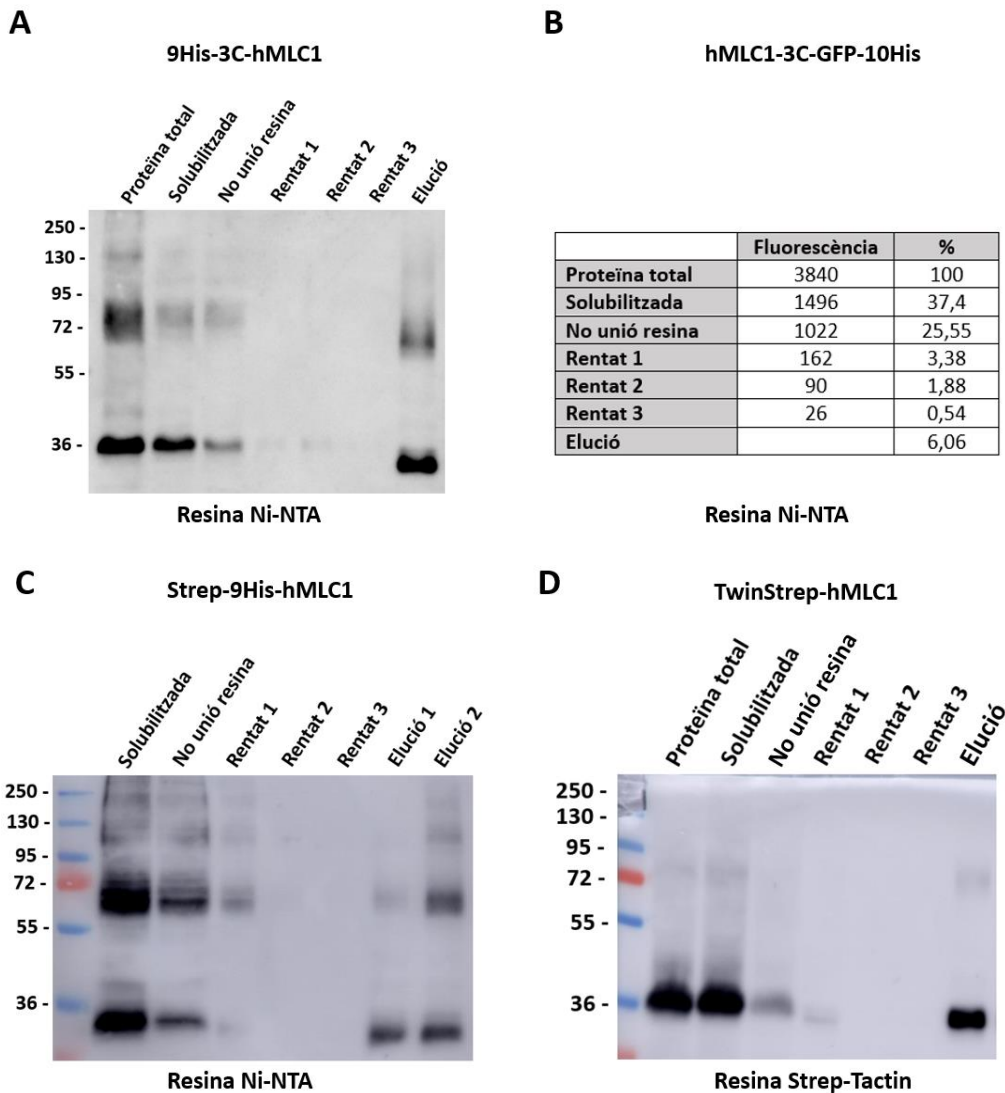


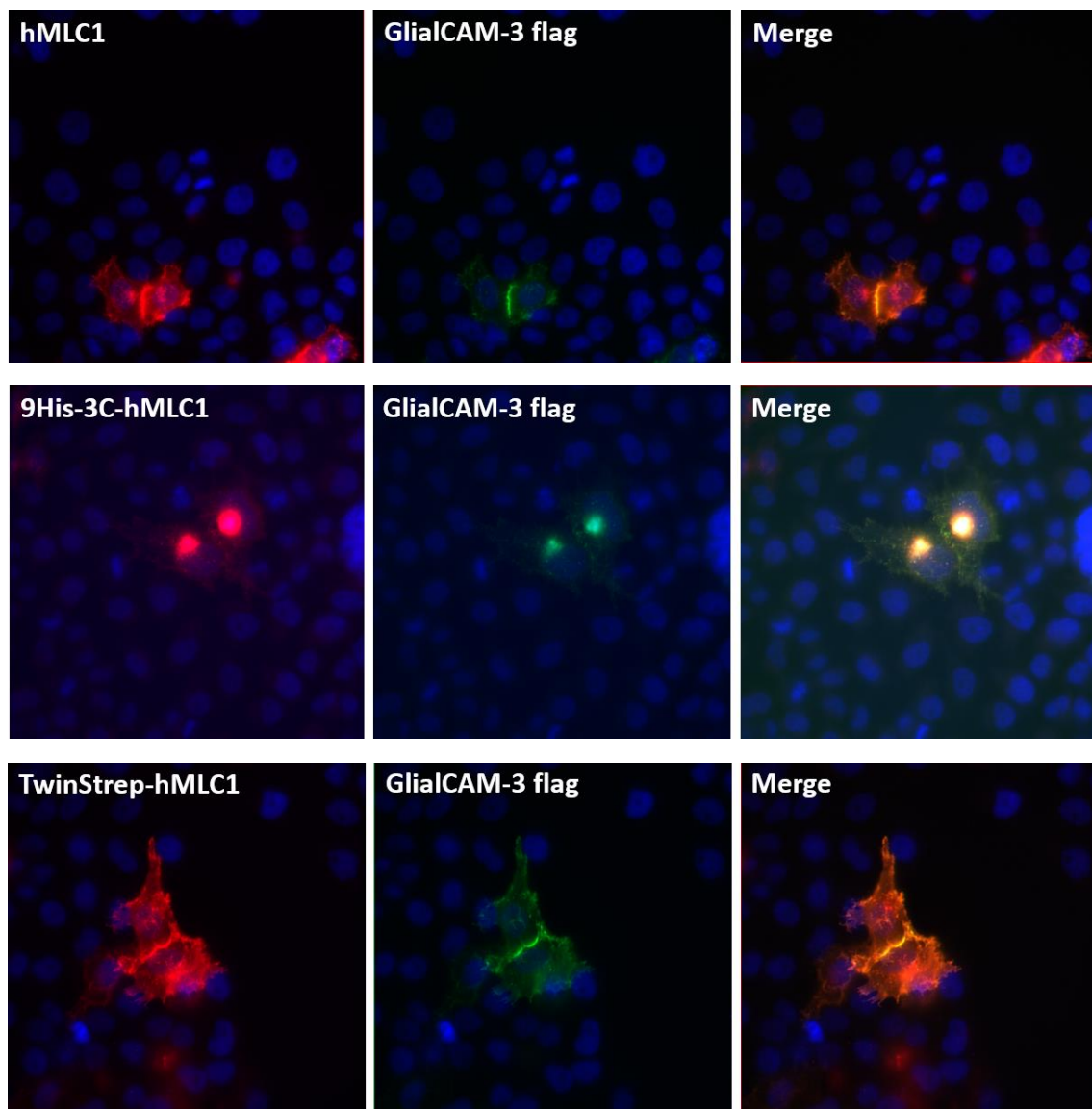
Figura 55. WB del procés de purificació detectant la proteïna MLC1. **A)** WB de la purificació de la proteïna 9His-3C-hMLC1 utilitzant la resina Ni-NTA. **B)** Anàlisi per fluorescència de la purificació de la proteïna hMLC1-3C-GFP-10His utilitzant la resina Strep-Tactin. **C)** WB de la purificació de la proteïna Strep-9His-hMLC1 utilitzant la resina Strep-Tactin. **D)** WB de la purificació de la proteïna TwinStrep-hMLC1 utilitzant la resina Strep-Tactin. La proteïna MLC1 s'ha detectat utilitzant l'anticòs N4 humà.

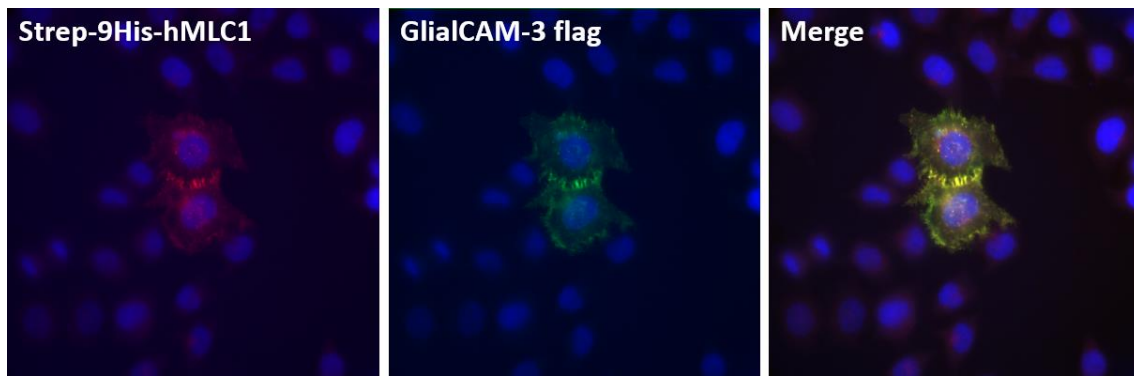
Aquests resultats van fer descartar el constructe hMLC1-3C-GFP-10His. Probablement, el *tag* de 10 histidines quedava amagat, implicant la seva unió a la resina de Ni-NTA, i per tant, la seva purificació.

Tot seguit, es va comprovar que els *tags* dels constructes 9His-3C-hMLC1, Strep-9His-hMLC1 i TwinStrep-hMLC1 incorporats a la proteïna hMLC1, no estiguessin afectant la seva conformació fisiològica. Degut a que es desconeix la funció de MLC1, la comprovació dels *tags* es va dur a terme analitzant l'arribada a les unions cel·lulars de la proteïna MLC1 quan es coexpressava amb la proteïna GlialCAM.

Estudis d'immunocitoquímica en cèl·lules HeLa mostraven que la proteïna 9His-3C-hMLC1 coexpressada amb la proteïna GlialCAM presentava un defecte a arribar a les unions cel·lulars comparat amb la proteïna hMLC1 coexpressada amb la proteïna GlialCAM. En canvi, les proteïnes TwinStrep-hMLC1 i Strep-9His-hMLC1 no mostraven diferències significatives comparat amb la proteïna hMLC1 coexpressada amb la proteïna GlialCAM (**figura 56**). Per tant, vam descartar el constructe 9His-3C-hMLC1, ja que els resultats d'immunocitoquímica mostraven una internalització, en comptes d'arribar a les unions cel·lulars com la proteïna WT.

A





B

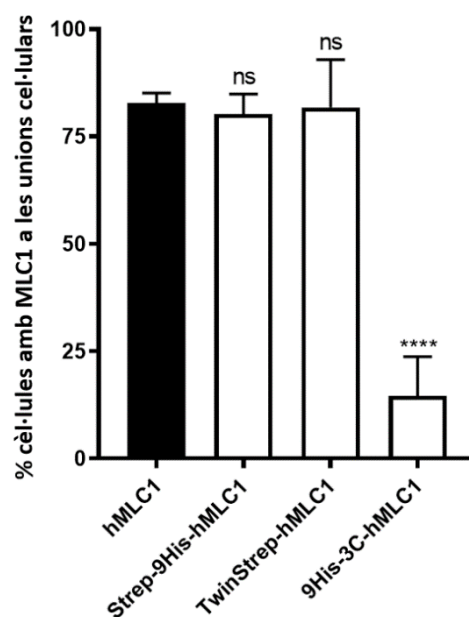


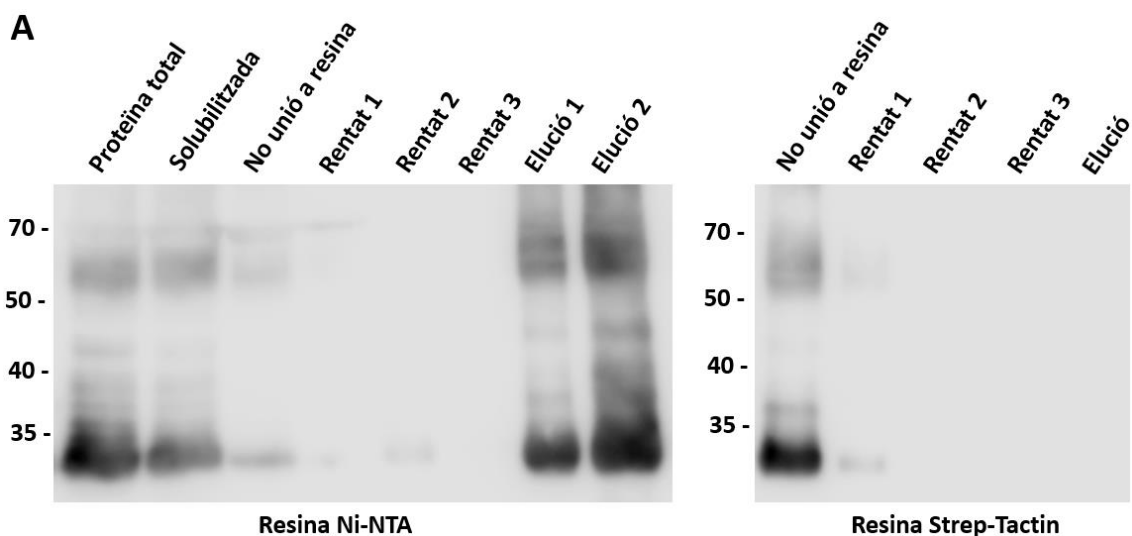
Figura 56. Estudis d'immunocitoquímica dels diferents constructes per purificar la proteïna MLC1. A) Imatges representatives de les proteïnes hMLC1, 9His-3C-hMLC1, TwinStrep-hMLC1, Strep-9His-hMLC1 (vermell) coexpressades amb la proteïna GlialCAM (verd) en cèl·lules HeLa. **B)** Quantificació del percentatge a les unions cel·lulars de 9His-3C-hMLC1 (167 cèl·lules), TwinStrep-hMLC1 (157 cèl·lules), Strep-9His-hMLC1 (149 cèl·lules) comparats amb GlialCAM WT (417 cèl·lules) i coexpressats amb la proteïna MLC1. El gràfic representa la mitjana \pm SEM. ns = no diferències estadístiques i **** $P < 0,0001$ en el test de comparació múltiple ANOVA Bonferroni comparat amb el WT. Resultats de tres experiments diferents.

Com hem mostrat anteriorment, el disseny dels constructes TwinStrep-hMLC1 i Strep-9His-hMLC1 permetia la purificació d'ambdues proteïnes sense efectar la seva expressió ni la seva localització nativa.

El plàsmid Strep-9His-hMLC1 es va dissenyar amb la finalitat de realitzar una doble purificació utilitzant els *tags* Strep i les 9 histidines, amb l'objectiu d'obtenir una mostra més neta (sense contaminants). Anteriorment, es va observar que la proteïna hMLC1 es

purificava amb el *tag* 9 histidines. Tot seguit, vam comprovar si era possible purificar la proteïna Strep-9His-hMLC1 utilitzant el *tag* Strep. Es va dur a terme una expressió a petita escala utilitzant les cèl·lules HEK 293T adherents, i es van realitzar dues dobles purificacions paral·lelament procedents de la mateixa expressió.

Anàlisi per WB del procés de la doble purificació, utilitzant el constructe Strep-9His-hMLC1, mostraven que quan la proteïna Strep-9His-hMLC1 era purificada primer amb la resina Ni-NTA es detectaven nivells baixos de MLC1 en el carril de WB de no unió a la resina i uns nivells alts de MLC1 en l'elució. Aquests resultats indicaven que el *tag* d'histidines s'unia a la resina Ni-NTA i permetia la seva purificació eluint amb imidazol. En canvi, quan l'elució obtinguda era purificada amb la resina Strep-Tactin només es detectava la proteïna en els sotanedants, indicant que MLC1 no s'unia a la resina (**figura 57A**). Al igual que en el cas anterior, quan la proteïna Strep-9His-hMLC1 era primer purificada amb la resina Strep-Tactin s'observava que la major part de la proteïna es perdia en el carril de WB de no unió a la resina, indicant que MLC1 no s'unia a la resina Strep-Tactin (**figura 57B**).



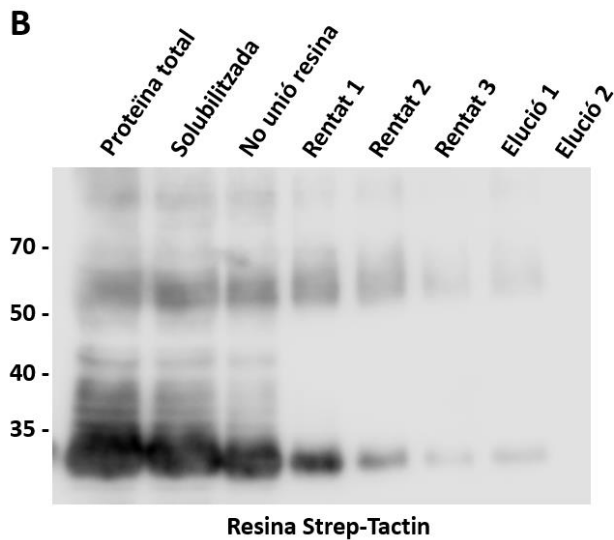


Figura 57. WB del procés de doble purificació de la proteïna Strep-9His-hMLC1 utilitzant les resina Ni-NTA i Strep-Tactin. A) WB de la doble purificació de la proteïna Strep-9His-hMLC1 purificant primer amb la resina Ni-NTA i seguidament amb la resina Strep-Tactin. La proteïna MLC1 va ser detectada utilitzant l'anticòs N4 humà. **B)** WB de la purificació de la proteïna Strep-9His-hMLC1 purificant amb la resina Strep-Tactin. La proteïna MLC1 va ser detectada utilitzant l'anticòs N4 humà.

Aquests resultats suggerien dues opcions. En primer lloc, que la conformació de la proteïna Strep-9His-hMLC1 amagava el *tag* Strep, impeding d'aquesta manera la seva unió amb la resina Strep-Tactin; o bé, que l'afinitat del *tag* Strep amb la resina Strep-Tactin era massa baixa per purificar la proteïna.

Per tant, abans de descartar el constructe Strep-9His-hMLC1, vam voler comprovar si augmentant l'afinitat amb la resina s'aconseguia dur a terme la purificació. Es va realitzar el mateix experiment mostrat anteriorment, però utilitzant la resina Strep-Tactin XT, la qual mostrava una afinitat major pel *tag* Strep al voltant del rang nM, a diferència de la resina Strep-Tactin que presentava una afinitat menor pel *tag* Strep al voltant del rang μ M (**figura 58**).

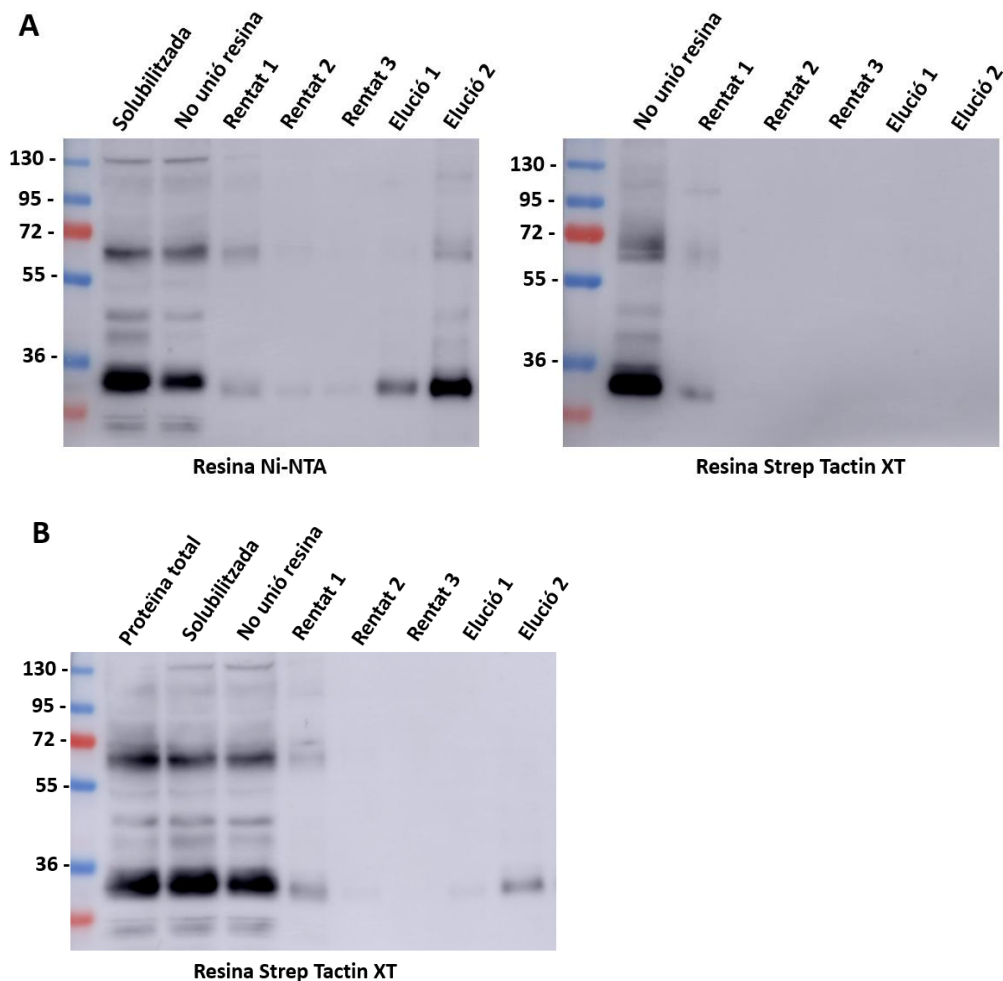


Figura 58. WB del procés de doble purificació de la proteïna Strep-9His-hMLC1 utilitzant les resina Ni-NTA i Strep-Tactin XT. A) WB de la doble purificació de la proteïna Strep-9His-hMLC1 purificant primer amb la resina Ni-NTA i seguidament amb la resina Strep-Tactin XT. La proteïna MLC1 va ser detectada utilitzant l'anticòs N4 humà. B) WB de la purificació de la proteïna Strep-9His-hMLC1 purificant amb la resina Strep-Tactin XT. La proteïna MLC1 va ser detectada utilitzant l'anticòs N4 humà.

Els resultats obtinguts de la purificació de la proteïna Strep-9His-hMLC1 utilitzant, la resina Strep-Tactin XT, indicaven que el *tag* Strep quedava amagat, impeding la seva utilització per purificar la proteïna. D'aquesta manera, vam seleccionar el constructe TwinStrep-hMLC1, ja que era l'únic constructe que permetia la seva purificació amb la resina Strep-Tactin, i mostrava una correcta expressió i un comportament igual que la proteïna WT.

Com hem mencionat anteriorment, la resina XT presenta una afinitat major pels *tags* Strep que la resina Strep-Tactin. En el cas del *tag* TwinStrep la resina Strep-Tactin presenta una afinitat al voltant del rang nM, en canvi utilitzant la resina Strep-Tactin XT s'obtenia una afinitat del rang pM. Per aquest motiu, vam voler analitzar si purificant la

proteïna TwinStrep-hMLC1 amb la resina Strep-Tactin XT érem capaços d'obtenir més quantitat de proteïna purificada que l'obtinguda utilitzant la resina Strep-Tactin.

Anàlisis per WB del procés de purificació de la proteïna TwinStrep-hMLC1 utilitzant la resina Strep-Tactin mostraven senyal de la proteïna MLC1 en la proteïna total, la solubilitzada, en l'elució 2 i 3, i en menor intensitat, en la proteïna no unida a la resina i el rentat 1 (**figura 59A**). En canvi, el WB de la purificació del constructe TwinStrep-hMLC1 utilitzant la resina Strep-Tactin XT només s'observava senyal de la proteïna MLC1 en la proteïna total, la solubilitzada, i en menor intensitat, en els carrils de WB de no unió a la resina i en el rentat 1, però no s'observava senyal de la proteïna MLC1 en la elució (**figura 59B**).

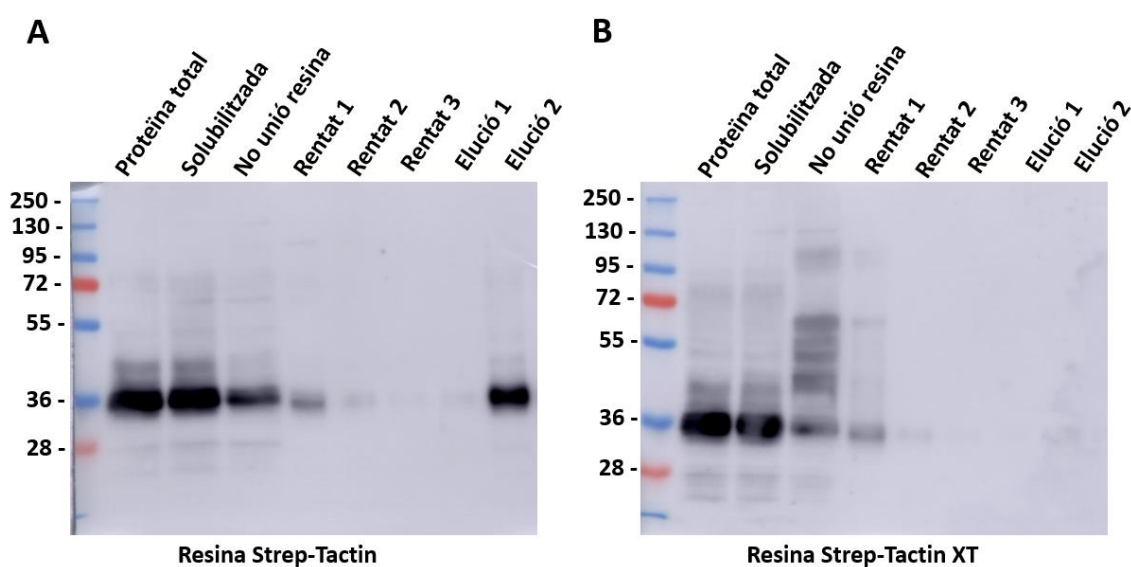


Figura 59. WB del procés de purificació de la proteïna TwinStrep-hMLC1 utilitzant la resina Strep-Tactin o Strep-Tactin XT. A) WB de la purificació de la proteïna TwinStrep-hMLC1 utilitzant la resina Strep-Tactin. La proteïna MLC1 va ser detectada utilitzant l'anticòs N4 humà. **B)** WB de la purificació de la proteïna TwinStrep-hMLC1 utilitzant la resina Strep-Tactin XT. La proteïna MLC1 va ser detectada utilitzant l'anticòs N4 humà.

Aquests resultats mostraven que la proteïna TwinStrep-hMLC1 s'unia a la resina Strep-Tactin XT, però no érem capaços d'eluir la proteïna degut, probablement, a l'alta afinitat que presentava la resina XT pel *tag* TwinStrep.

Per tant, després dels diferents resultats obtinguts vam seleccionar el constructe TwinStrep-hMLC1 i la resina Strep-Tactin per dur a terme la purificació de la proteïna hMLC1.

3.2 OPTIMITZACIÓ DEL SISTEMA DE PURIFICACIÓ DE LA PROTEÏNA MLC1 HUMANA.

El nostre objectiu era obtenir una mostra suficientment homogènia que permetés obtenir imatges de qualitat per resoldre l'estructura tridimensional de la proteïna hMLC1. Per aquest motiu, un cop seleccionat el constructe TwinStrep-hMLC1 i la resina Strep-Tactin com a sistema de purificació, vam analitzar diferents aspectes per optimitzar el sistema de purificació.

3.2.1 Coexpressió de la proteïna MLC1 humana amb la proteïna GlialCAM.

Estudis previs del laboratori demostraven que la proteïna GlialCAM actuava com una xaperona per la proteïna MLC1, protegint-la de la degradació associada al reticle endoplasmàtic (Capdevila-Nortes et al., 2013) i permetent la seva localització a les unions cel·lulars (López-Hernández, Ridder, et al., 2011; López-Hernández, Sirisi, et al., 2011).

Tenint en compte aquests resultats, vam iniciar la coexpressió de la proteïna TwinStrep-hMLC1 amb la proteïna GlialCAM-3flag (incorporava un *tag* 3 flag a l'extrem C-terminal de GlialCAM) per analitzar si la coexpressió d'ambdues proteïnes afavoria l'estabilitat i les quantitats de hMLC1 obtingudes. A més, vam analitzar si érem capaços de purificar el complex hMLC1/GlialCAM, ja que la resolució del complex d'ambdues proteïnes podria ser essencial per entendre les seves funcions fisiològiques, com succeeix en altres proteïnes de membrana, com la tetraspanina CD81 (Zimmerman et al., 2016).

Per tant, la primera prova que vam realitzar va ser analitzar per SEC quin detergent era el més adient per purificar el complex hMLC1/GlialCAM. Per fer-ho, es van realitzar dues purificacions paral·leles de la proteïna TwinStrep-hMLC1 sola i coexpressada amb la proteïna GlialCAM-3flag amb els tres detergents seleccionats anteriorment per FSEC (DDM amb CHS, CY-6 amb CHS i digitonina).

Els perfils de SEC, de la purificació del constructe TwinStrep-hMLC1 utilitzant el detergent DDM amb CHS, no mostraven cap diferència amb la presència o no de la proteïna GlialCAM-3flag. En canvi, els perfils de SEC de la purificació del constructe TwinStrep-hMLC1, utilitzant el detergent digitonina o CY-6 amb CHS, mostraven una

disminució dels nivells d'absorbència del volum mort de la columna (*void volume*, 8 mL) comparat amb el pic majoritari (11 mL) quan la proteïna hMLC1 era coexpressada amb la proteïna GlialCAM (**figura 60A**). Aquests resultats ens van fer descartar el detergent DDM amb CHS per purificar el complex hMLC1/GlialCAM.

Per altra banda, els anàlisis per WB de la purificació de la proteïna TwinStrep-hMLC1 utilitzant els detergents CY-6 amb CHS i DDM amb CHS no mostraven elució de la proteïna GlialCAM. En canvi, la purificació de la proteïna TwinStrep-hMLC1 utilitzant el detergent digitonina mostrava una tènue senyal de la proteïna GlialCAM en l'elució (**figura 60B**). Aquests resultats mostraven que el detergent CY-6 amb CHS trencava la interacció entre les proteïnes TwinStrep-hMLC1 amb la proteïna GlialCAM-3flag, implicant la purificació del complex. Per aquest motiu, el CY-6 amb CHS va ser descartat per purificar el complex hMLC1/GlialCAM.

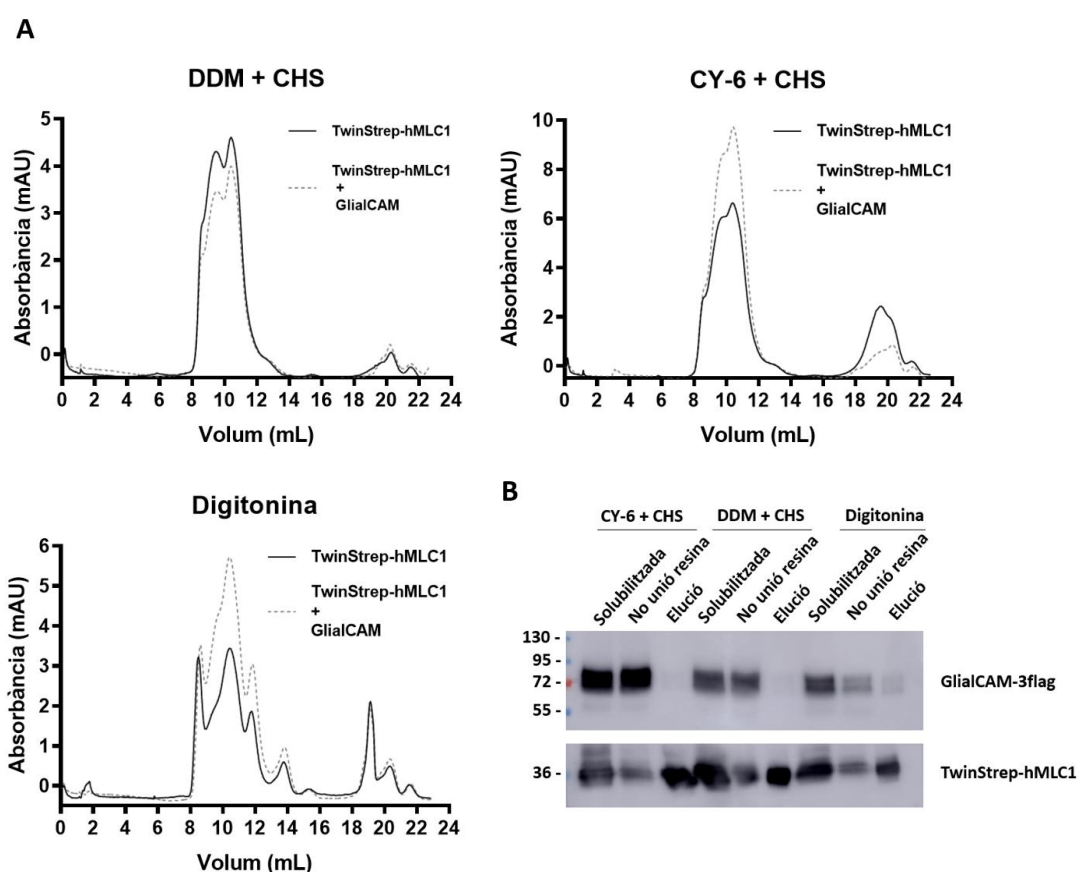


Figura 60. Purificació de la proteïna TwinStrep-hMLC1 coexpressada o no amb la proteïna GlialCAM-3flag. **A)** Perfils de SEC de la purificació de la proteïna TwinStrep-hMLC1 sola (línia contínua) o coexpressada amb la proteïna GlialCAM (línia discontinua) amb els detergents DDM amb CHS, CY-6 amb CHS i digitonina. Es va utilitzar la columna *Superdex 200 Increase 10/300 GL* de 25 mL a un flux de 0,3 mL/min. **B)** WB de la purificació de la proteïna TwinStrep-hMLC1 coexpressada amb la proteïna GlialCAM-3flag amb els detergents CY-6 amb CHS, DDM amb CHS i digitonina. La proteïna GlialCAM s'ha detectat utilitzant l'anticòs anti-flag i la proteïna MLC1 s'ha detectant utilitzant l'anticòs N4 humà.

Els resultats obtinguts indicaven que la digitonina era l'únic detergent que permetia la purificació del complex MLC1/GlialCAM. Aquests resultats coincidien amb estudis previs del laboratori d'interacció de proteïnes que mostraven que la digitonina era l'únic detergent capaç de mantenir la interacció entre MLC1 i GlialCAM (López-Hernández, Ridder, et al., 2011). Per tant, finalment vam seleccionar la digitonina com a detergent per purificar el complex hMLC1/GlialCAM.

3.2.2 Utilització del detergent *glyco-diosgenin* (GDN) com a substitut de la digitonina.

En els estudis d'estructura, l'homogeneïtat de la mostra obtinguda després de la purificació és un punt important per poder obtenir imatges de qualitat o formar cristalls d'alta resolució que permetin resoldre l'estructura tridimensional de la proteïna d'estudi. La digitonina és un detergent natural extret de la planta *Digitalis purpurea*. Aquest fet resulta en una certa variabilitat en els diferents lots de digitonina i augmenta l'heterogeneïtat entre les diferents purificacions. Com a alternativa, el detergent GDN (de l'anglès *Glyco-Diosgenin*) s'utilitza com a detergent substitutori de la digitonina, ja que presenten una estructura similar (tot i que no idèntica), i a diferència de la digitonina, és un detergent sintètic; per tant, no presenta variabilitat entre els diferents lots, fent que les purificacions siguin més reproduïbles (Chaea et al., 2008). Per aquest motiu, abans de seleccionar la digitonina com a detergent per purificar el complex MLC1/GlialCAM vam voler analitzar el perfil de SEC obtingut després de purificar la proteïna TwinStrep-hMLC1 amb el detergent GDN.

La purificació de la proteïna TwinStrep-hMLC1 coexpressada amb la proteïna GlialCAM-3flag utilitzant la digitonina com a detergent mostrava un perfil de SEC amb uns nivells baixos de *void volume* (8 mL) i 3 pics al voltant dels 9, 10 i 11 mL (**figura 61A**). En canvi, la purificació de la proteïna TwinStrep-hMLC1 coexpressada amb la proteïna GlialCAM-3flag utilitzant el GDN com a detergent mostrava un perfil de SEC amb un pic majoritari corresponent al *void volume* (8 mL) (**figura 61B**). Per altra banda, comparant els WBs dels dos processos de purificació (utilitzant digitonina o GDN), s'observava que en el cas de la digitonina (**figura 61A**) els nivells d'elució tant de la proteïna MLC1 com de la

proteïna GlialCAM eren més elevats que els nivells d'elució observats en el GDN (**figura 61B**).

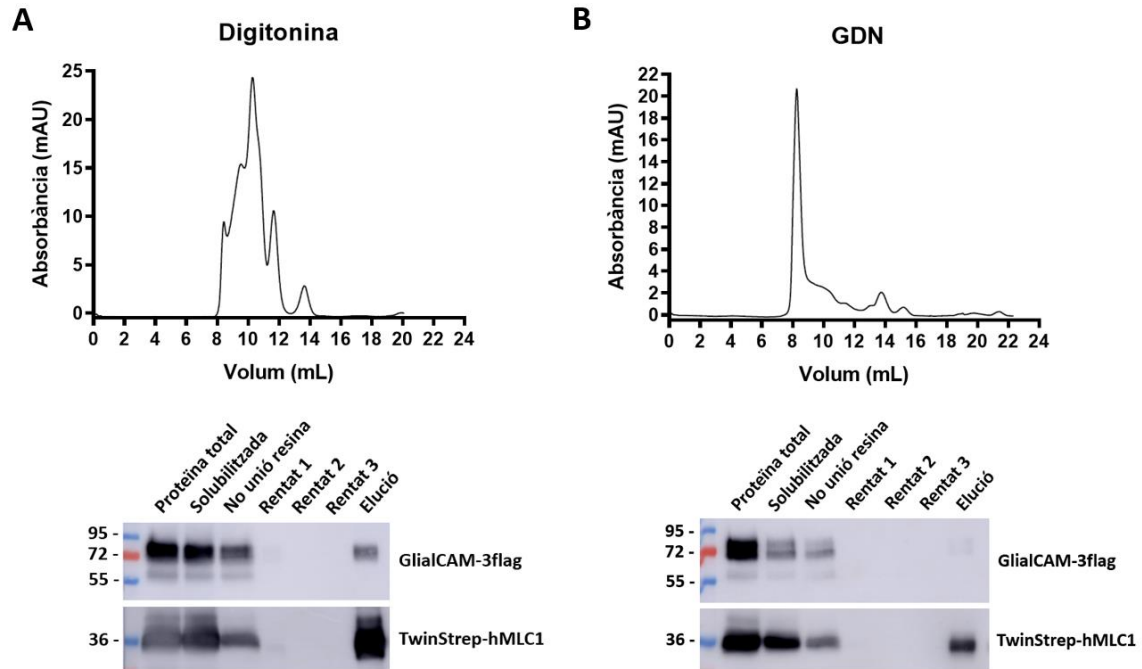


Figura 61. Purificació de la proteïna TwinStrep-hMLC1 coexpressada amb la proteïna GlialCAM-3flag. A) Perfil de SEC després de purificar la proteïna TwinStrep-hMLC1 amb digitonina utilitzant la resina Strep-Tactin. La proteïna va córrer a 0,3 mL/min utilitzant la columna *Superdex 200 Increase 10/300 GL* de 25 mL. A sota, el WB de la purificació de la proteïna TwinStrep-hMLC1 detectada amb l'anticòs N4 humà i la proteïna GlialCAM-3flag detectada amb l'anticòs anti-flag. **B)** Perfil de SEC després de purificar la proteïna TwinStrep-hMLC1 amb GDN utilitzant la resina Strep-Tactin. La proteïna va córrer a 0,3 mL/min utilitzant la columna *Superdex 200 Increase 10/300 GL* de 25 mL. A sota, el WB de la purificació de la proteïna TwinStrep-hMLC1 detectada amb l'anticòs N4 humà i la proteïna GlialCAM-3flag detectada amb l'anticòs anti-flag.

Amb els resultats obtinguts, es va descartar el detergent GDN per purificar les proteïnes hMLC1 i GlialCAM, ja que el perfil de SEC mostrava que les proteïnes eren inestables, apareixent la majoria de proteïna agregada (*void volume*). Malgrat la variabilitat dels diferents lots de digitonina, es va escollir aquesta com a detergent ja que era la única que presentava nivells d'elució de la proteïna GlialCAM quan purificàvem la proteïna hMLC1.

3.2.3 Optimització de les condicions de purificació amb digitonina.

La solubilització de les proteïnes de membrana és un procés complex on les proteïnes i els lípids, que estan junts en la membrana plasmàtica, són dissociats adequadament en una solució amb detergent. A mesura que augmentes la quantitat de detergent utilitzat durant la solubilització i/o el temps de solubilització, augmenta la deslipidació de la proteïna d'estudi podent efectuar la seva conformació fisiològica. Per tant, la quantitat de detergent utilitzat durant la solubilització i el temps de solubilització són punts crítics per obtenir la proteïna de membrana d'estudi soluble sense alterar la seva conformació fisiològica (Kalipatnapu & Chattopadhyay, 2005).

Un cop seleccionada la digitonina, es va analitzar quin era el percentatge de digitonina i el temps de solubilització més òptim per obtenir més quantitat de proteïna solubilitzada. Per realitzar aquest estudi, es va utilitzar la proteïna hMLC1-3C-GFP-10His per obtenir ràpidament el percentatge de solubilització de hMLC1 mesurant els nivells de fluorescència de la GFP per fluorimetria.

El percentatge de solubilització quan s'utilitzava 1% de digitonina durant 1 hora era de 15,33%; quan augmentàvem el temps de solubilització a 2 hores era de 22,77%. Per altra banda, el percentatge de solubilització quan s'utilitzava 2% de digitonina durant 1 hora era de 26,06%; quan augmentàvem el temps de solubilització a 2 hores era 39,41% (**figura 62**). Els anàlisis per fluorimetria mostraven que el percentatge de solubilització de la proteïna hMLC1 augmentava a mesura que augmentàvem el temps de solubilització i el percentatge de digitonina.

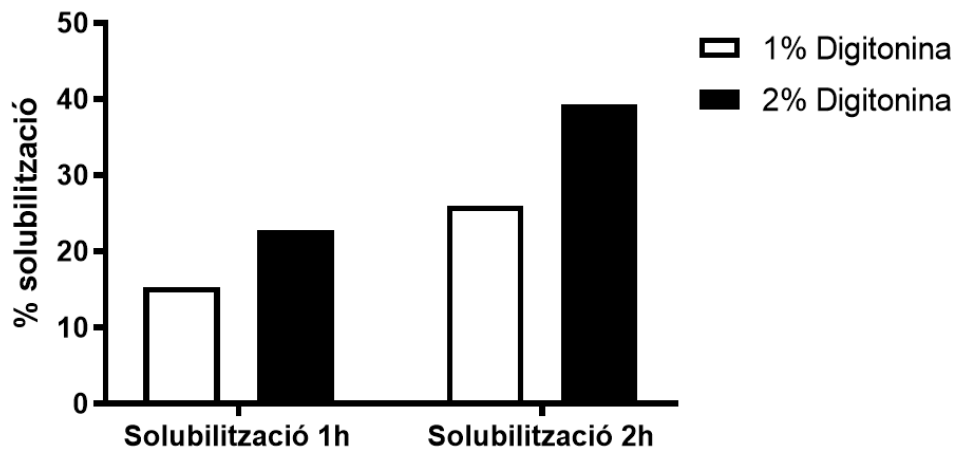


Figura 62. Quantificació del percentatge de solubilització de la proteïna MLC1 humana amb digitonina. L'estudi s'ha realitzat utilitzant el constructe hMLC1-3C-GFP-10His. Les condicions analitzades han sigut 1% de digitonina durant 1 hora de solubilització (15,33%), 2% de digitonina durant 1 hora de solubilització (22,77%), 1% de digitonina durant 2 hores de solubilització (26,06%) i 2% de digitonina durant 2 hores de solubilització (39,41%).

Gràcies els resultats obtinguts vam seleccionar la condició de solubilitzar la mostra durant 2 hores utilitzant 2% de digitonina, ja que era la condició més òptima per obtenir més quantitat de proteïna hMLC1 solubilitzada.

Un altre punt crític a tenir en compte durant la solubilització d'una proteïna de membrana és la ràtio proteïna:detergent, ja que depenent de la ràtio utilitzada es pots obtenir diferents mides de micel·les degut a la deslipidació. Com s'ha comentat anteriorment, l'augment de detergent durant la solubilització augmenta la deslipidació de la proteïna de membrana d'estudi. Per tant, per poder reproduir la purificació de la proteïna de membrana, és important definir la ràtio proteïna:detergent utilitzada durant la solubilització (Kalipatnapu & Chattopadhyay, 2005).

Per analitzar quina ràtio era més adequada per purificar el complex MLC1/GlialCAM, es van realitzar tres purificacions paral·leles, utilitzant tres ràtios de solubilització proteïna:detergent (pes:pes) diferents (1:4, 1:8 i 1:12). En totes 3 condicions es va utilitzar la mateixa expressió de TwinStrep-hMLC1 i GlialCAM-3flag i es va solubilitzar en un total de 2% de digitonina. La SEC es va realitzar utilitzant la columna *Superdex 200 Increase 10/300 GL* a un flux de 0,3 mL/min.

Els perfils de SEC de les tres purificacions realitzades a una ràtio proteïna:detergent 1:4, 1:8 i 1:12 no mostraven cap diferència de mobilitat en els pics, apareixent en les 3

purificacions al voltant dels 9, 10 i 11 mL (**figura 63**). Tot i així, sí que s'observava una diferència en la relació entre els diferents pics de cada condició. El perfil de SEC de ràtio 1:12 presentava uns nivells d'absorbància del *void* (8 mL) inferiors que els perfils de SEC de ràtio 1:4 i 1:8. Per altra banda, la relació entre el *void* (8 mL) i el pic 2 (11 mL) era major en el ràtio 1:12 comparat amb els ràtios 1:4 i 1:8 (**figura 63**).

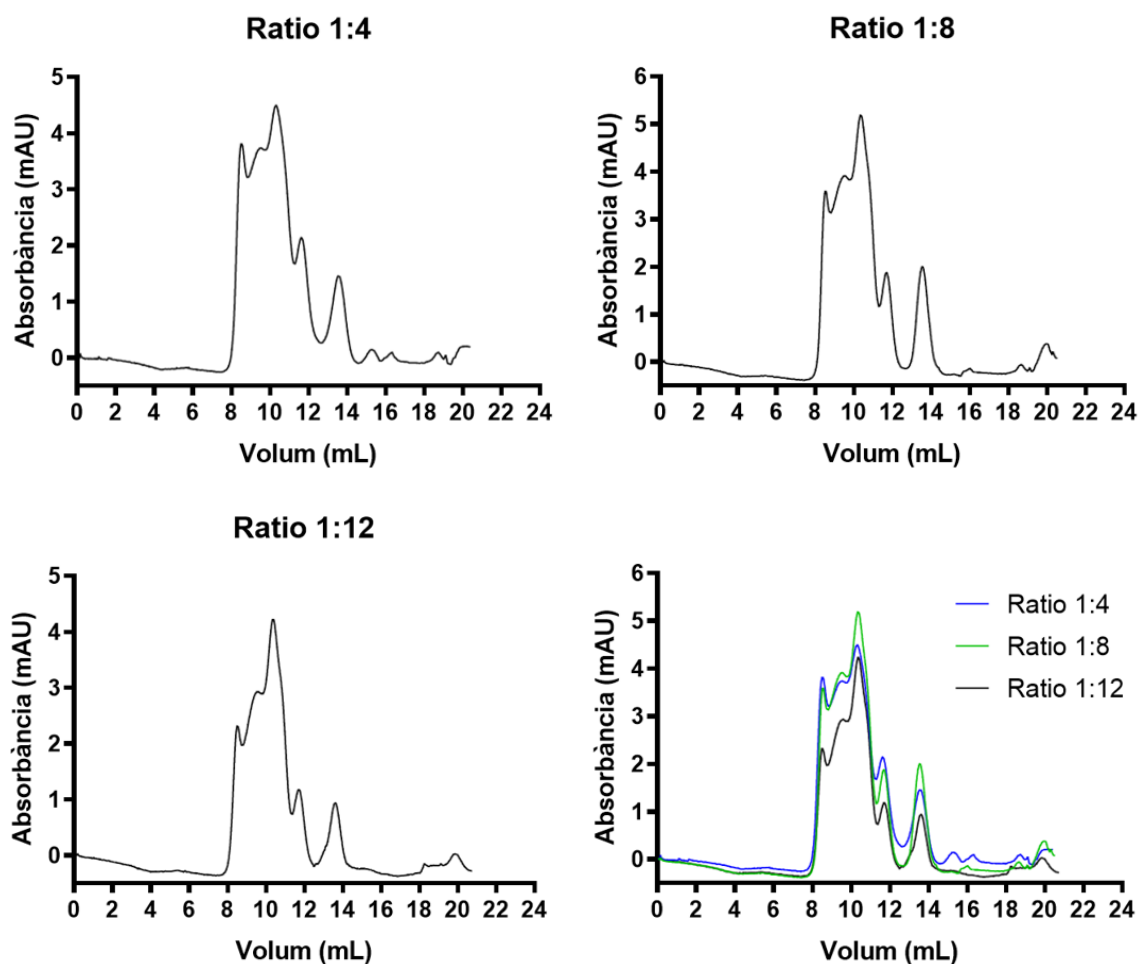


Figura 63. Purificació de la proteïna TwinStrep-hMLC1 coexpressada amb la proteïna GlialCAM-3flag utilitzant diferents ratios proteïna:detergent. Perfils de SEC de diferents ratios proteïna:detergent després de purificar la proteïna TwinStrep-hMLC1 coexpressada amb GlialCAM-3flag amb digitonina al 2% utilitzant la resina Strep-Tactin. La proteïna va córrer a 0,3 mL/min utilitzant la columna Superdex 200 Increase 10/300 GL de 25 mL.

D'aquesta manera, es va seleccionar la ràtio proteïna:detergent 1:12, ja que s'obtenia uns nivells de *void volume* inferiors que en les ràtios 1:4 i 1:8, i la relació entre el volum mort i el pic 2 era major, indicant l'afavoriment de l'estat oligomèric del pic 2.

3.2.4 Purificació del complex MLC1/GlialCAM utilitzant el *tag* 3flag incorporat a l'extrem C-terminal de la proteïna GlialCAM (GlialCAM-3flag).

Degut als baixos nivells de GlialCAM que obteníem purificant amb el *tag* Twin-Strep incorporat en la proteïna MLC1, es va analitzar si purificant utilitzant el *tag* 3flag que incorporava la proteïna GlialCAM s'afavoria la obtenció del complex MLC1/GlialCAM.

Utilitzant membranes provinents del mateix cultiu cel·lular que expressaven TwinStrep-hMLC1 i GlialCAM-3flag, es van dur a terme dues purificacions en paral·lel per comparar els nivells del complex hMLC1/GlialCAM que obteníem al purificar utilitzant el *tag* TwinStrep incorporat a la proteïna MLC1 o el *tag* 3flag incorporat a la proteïna GlialCAM. En una purificació es va utilitzar la resina Strep-Tactin (**figura 64A**) i en l'altra la resina Flag (**figura 64B**). En totes dues purificacions es va obtenir una concentració final de proteïna de 0,24 mg/mL que va ser injectada a l'AKTA pure, utilitzant la columna *Superdex 200 Increase 10/300 GL* a un flow de 0,3 mL/min.

Anàlisi per WB del procés de purificació de la proteïna TwinStrep-hMLC1 coexpressada amb la proteïna GlialCAM-3flag utilitzant la resina Strep-Tactin mostrava una banda intensa de la proteïna TwinStrep-hMLC1 en la proteïna total, la solubilitzada i en l'elució. La proteïna GlialCAM era detectada amb una elevada intensitat en la proteïna total i la solubilitzada, i amb una banda de baixa intensitat en l'elució (**figura 64A**). Per altra banda, el WB del procés de purificació de la proteïna TwinStrep-hMLC1 coexpressada amb la proteïna GlialCAM-3flag utilitzant la resina Flag, mostrava una banda intensa de la proteïna TwinStrep-hMLC1 en la proteïna total, la solubilitzada i la proteïna no unida a la resina, i es detectava una banda tènue en l'elució. La proteïna GlialCAM-3flag era detectada amb una intensitat elevada en la proteïna total i solubilitzada, i es detectava una banda tènue en l'elució (**figura 64B**).

El perfil de SEC utilitzant la resina Strep-Tactin mostrava un pic majoritari corresponent al *void volume* (8 mL), però també s'observaven els 3 pics característics de MLC1 i GlialCAM (9, 10 i 11 mL) (**figura 64A**). En canvi, el perfil de SEC utilitzant la resina Flag mostrava un únic pic corresponent al *void volume* (8 mL) (**figura 64B**).

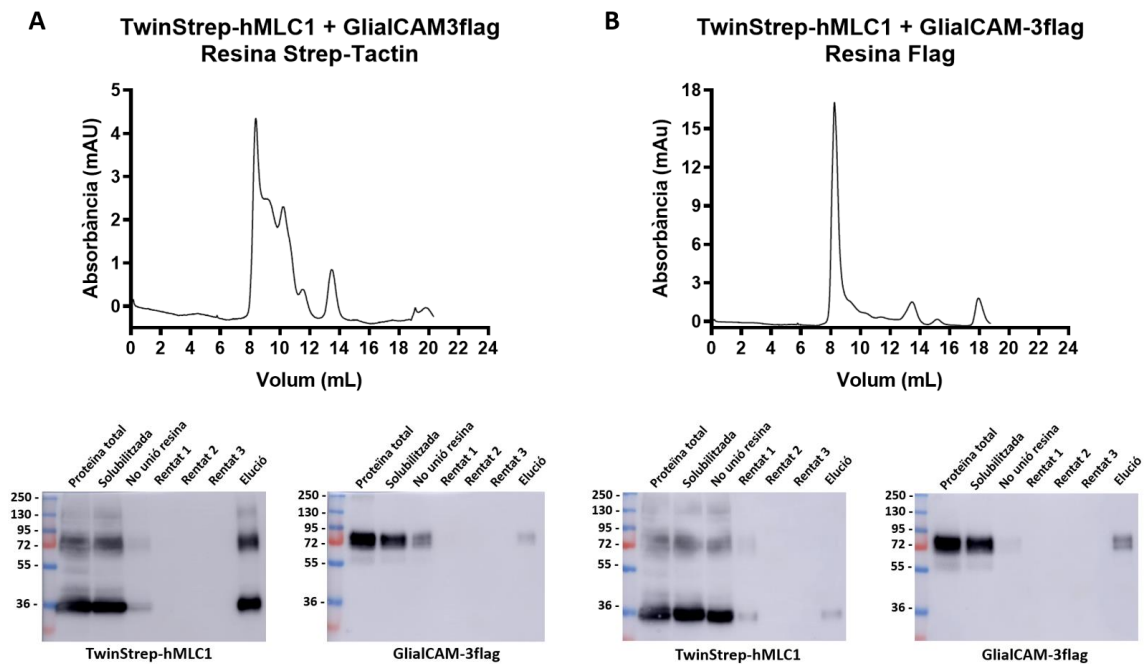


Figura 64. Purificació de la proteïna TwinStrep-hMLC1 coexpressada amb la proteïna GlialCAM-3flag. **A)** Perfil de SEC després de purificar la proteïna TwinStrep-hMLC1 coexpressada amb la proteïna GlialCAM-3flag amb digitonina al 2% utilitzant la resina Strep-Tactin. La proteïna va córrer a 0,3 mL/min utilitzant la columna *Superdex 200 Increase 10/300 GL* de 25 mL. A sota, el WB de la purificació de la proteïna TwinStrep-hMLC1 detectada amb l'anticòs N4 humà i la proteïna GlialCAM-3flag detectada amb l'anticòs anti-flag. **B)** Perfil de SEC després de purificar la proteïna TwinStrep-hMLC1 coexpressada amb la proteïna GlialCAM-3flag amb digitonina al 2% utilitzant la resina Flag. La proteïna va córrer a 0,3 mL/min utilitzant la columna *Superdex 200 Increase 10/300 GL* de 25 mL. A sota, el WB de la purificació de la proteïna TwinStrep-hMLC1 detectada amb l'anticòs N4 humà i la proteïna GlialCAM-3flag detectada amb l'anticòs anti-flag.

Els resultats obtinguts van fer descartar la purificació del complex MLC1/GlialCAM utilitzant el *tag* 3flag que incorporava la proteïna GlialCAM, ja que el perfil de SEC mostrava que la majoria de proteïna purificada tendia a agregar (*void volume*).

Degut als baixos nivells que obteníem del complex hMLC1/GlialCAM durant la purificació, vam analitzar per SEC l'estabilitat de la proteïna GlialCAM. Es va realitzar una expressió d'un litre de cultiu de la proteïna GlialCAM-3flag i es va purificar utilitzant la resina Flag. Un cop purificada, es va concentrar a 0,2 mg/mL i es va realitzar una SEC utilitzant la columna *Superdex 200 Increase 10/300 GL* de 25 mL a un flux de 0,3 mL/min.

El perfil de SEC mostrava un pic majoritari corresponent al *void volume* amb una absorbància d'aproximadament 9 mAU, i seguidament, dos pics minoritaris al voltant de 11 i 13 mL amb uns nivells d'absorbància inferiors a 2 mAU. L'anàlisi per WB dels 3

pics recollits després de la SEC només detectava la proteïna GlialCAM en el pic 2 (**figura 65**).

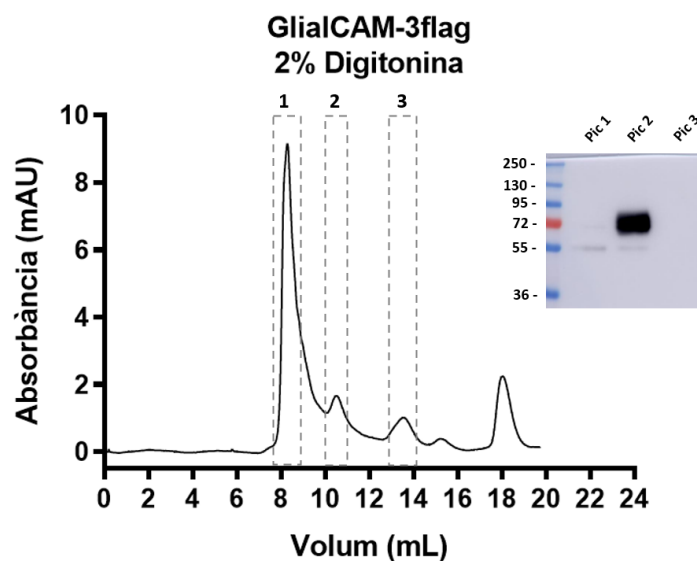


Figura 65. Purificació de la proteïna GlialCAM-3flag utilitzant la resina Flag. Perfil de SEC després de purificar la proteïna GlialCAM-3flag amb digitonina al 2% utilitzant la resina Flag. La proteïna va córrer a 0,3 mL/min utilitzant la columna *Superdex 200 Increase 10/300 GL* de 25 mL. A la dreta, el WB dels 3 pics senyalats en el perfil de SEC, detectant la proteïna GlialCAM-3flag amb l'anticòs anti-flag.

Els resultats obtinguts mostraven que la proteïna GlialCAM era inestable en digitonina, ja que el pic majoritari observat en la SEC era el *void volume* corresponent a agregats. Aquest fet explicava perquè tot i els bons nivells d'expressió que observàvem d'ambdues proteïnes (MLC1 i GlialCAM), purificàvem uns nivells baixos del complex hMLC1/GlialCAM.

Finalment, es va realitzar una purificació de la proteïna TwinStrep-hMLC1 coexpressada amb la proteïna GlialCAM-3flag amb digitonina provinents de 2 litres de cultiu, amb l'objectiu de concentrar la mostra al màxim i analitzar per SEC l'estabilitat de la proteïna purificada.

La proteïna TwinStrep-hMLC1 amb GlialCAM-3flag va ser concentrada fins a 2 mg/mL i va ser injectada a la columna *Superdex 200 Increase 10/300 GL* a un flux de 0,3 mL/min. La SEC mostrava el mateix perfil que l'observada anteriorment, indicant que la proteïna no agregava al portar-la a 2 mg/mL (**figura 66A**). Per altra banda, els 3 pics (9, 11 i 12 mL) van ser recollits i analitzats per WB detectant la proteïna TwinStrep-hMLC1 i

GlialCAM-3flag amb els anticossos N4 humà i anti-flag, respectivament. Els anàlisis per WB mostraven que la proteïna MLC1 era detectada en els 3 pics. La intensitat del senyal detectada per WB de MLC1 corresponia als nivells d'absorbància obtinguts en el perfil de SEC, sent la intensitat del pic 2 major que la del pic 1 i finalment la del pic 3 la menor. La proteïna GlialCAM només era detectada en el pic 1 i 2 (**figura 66B**), suggerint que els pics 1 i 2 estaven formats per complexos MLC1/GlialCAM, mentre que el pic 3 únicament presentava MLC1. A més, es va realitzar una tinció de plata dels 3 pics que mostrava una banda majoritària al voltant dels 36 kDa en els 3 pics que coincidia amb la banda de MLC1 detectada per WB en els 3 pics. Per altra banda, en el pic 1 i 2, la tinció de plata mostrava dues bandes al voltant dels 72 kDa, una més ampla i un altre més fina, que coincidien amb les bandes de MLC1 i GlialCAM detectades per WB en el pic 1 i 2 (**figura 66C**).

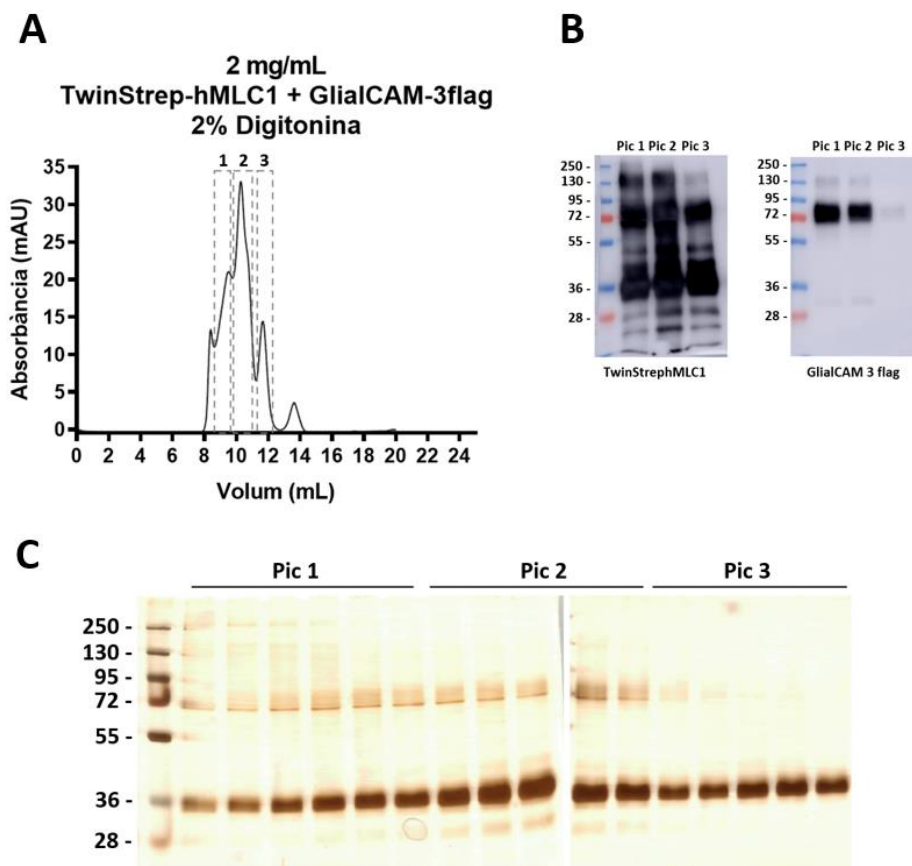


Figura 66. Purificació de la proteïna TwinStrep-hMLC1 coexpressada amb la proteïna GlialCAM-3flag utilitzant 2% de digitonina. A) Perfil de SEC després de purificar la proteïna TwinStrep-hMLC1 amb digitonina al 2% utilitzant la resina Strep-Tactin. La proteïna va ser injectada a una concentració de 1,98 mg/mL i va córrer a 0,3 mL/min utilitzant la columna *Superdex 200 Increase 10/300 GL* de 25 mL. **B)** WB dels pics 1, 2 i 3 recollits de la SEC de la proteïna TwinStrep-hMLC1 detectada amb l'anticòs N4 humà i la proteïna GlialCAM-3flag detectada amb l'anticòs anti-flag. **C)** Tinció de plata dels pics 1, 2 i 3 recollits de la SEC.

Aquests resultats van mostrar que la proteïna TwinStrep-hMLC1 coexpressada amb la proteïna GlialCAM-3flag podia ser concentrada a 2 mg/mL sense efecte la seva estabilitat. A més, el perfil de SEC mostrava 3 estats oligomèrics diferents, un pic 1 i un pic 2 on es detectava ambdues proteïnes i un pic 3 on només es detectava la proteïna TwinStrep-hMLC1.

Per tant, els diferents resultats obtinguts van permetre definir un sistema de purificació de les proteïnes hMLC1 i GlialCAM coexpressades en cèl·lules en suspensió HEK 2936E.

Resumint, els constructes utilitzats eren el TwinStrep-hMLC1 que incorporava el doble *tag* Strep a l'extrem N-terminal de la proteïna MLC1 humana (hMLC1), i GlialCAM-3flag que incorpora un *tag* 3flag a l'extrem C-terminal de la proteïna GlialCAM. La digitonina va ser definida com l'únic detergent capaç de purificar el complex hMLC1/GlialCAM, encara que s'obtenien nivells baixos, i les condicions de solubilització definides eren 2% de digitonina durant 2 hores a una ràtio proteïna:detergent de 1:12 (pes:pes). La resina utilitzada era la Strep-Tactin. La columna utilitzada per realitzar la *Size Exclusion Chromatography* (SEC) era la *Superdex 200 Increase 10/300 GL* de 25 mL a un flux de 0,3 mL/min.

3.3 RESULTATS PRELIMINARS DE LA RESOLUCIÓ DE L'ESTRUCTURA DEL COMPLEX MLC1/GLIALCAM PER CRIOMICROSCÒPIA ELECTRÒNICA (CRYO-EM).

La criomicroscòpia electrònica (cryo-EM) és una tècnica recent que s'utilitza per resoldre l'estructura tridimensional (3D) de biomolècules. Aquesta tècnica, a diferència de la cristal·lografia per raigs X, no requereix que la mostra estigui cristal·litzada i permet veure com es mouen i interactuen les biomolècules més fàcilment que en cristal·lografia (Bai et al., 2015).

A nivell general, la tècnica consisteix a projectar els raigs d'electrons a través de la mostra, els quals interactuen amb les molècules que conté i projecten una imatge de dues dimensions (2D) que són captades per un detector d'alta resolució. Per evitar que les biomolècules es degradin a causa dels raigs d'electrons, la mostra és congelada ràpidament amb nitrogen líquid utilitzant una fina capa de gel amorf o vitri. Aquesta

substància evita que l'aigua formi una estructura cristal·lina, evitant que els raigs d'electrons difractin fortament i tapin la informació estructural obtinguda de les biomolècules. Finalment, mitjançant programes informàtics es realitzen múltiples imatges de les proteïnes que conté la teva mostra i s'organitzen en funció de la seva orientació. Un cop classificades, s'obtenen les imatges 2D les quals a través de diferents algorismes es pot generar les imatges 3D de les proteïnes, obtenint d'aquesta manera la seva estructura 3D (Bai et al., 2015; Wei J, 2018).

Actualment, estan creixent el nombre de proteïnes de membrana en micel·les de detergents que són estudiades per cryo-EM. Alguns exemples de proteïnes de membrana que la seva estructura ha estat resolta per cryo-EM són: el canal Trp (de l'anglès *Transient Receptor Potential*) (Grieben et al., 2017), el receptor glutamat (Marceau et al., 2015), el canal de calci Cav1.1 (J. Wu et al., 2016) i el complex mitocondrial de mamífer I (Fiedorczuk et al., 2016).

Per dur a terme els estudis per cryo-EM, es va iniciar una col·laboració amb el grup d'investigació del Dr. Óscar Llorca del CNIO (*Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas*) on el doctorand Nayim González Rodríguez va realitzar la preparació de la mostra i l'obtenció de les imatges per cryo-EM.

Abans d'enviar la mostra al CNIO, vam analitzar per SEC si érem capaços de col·lectar els diferents pics per separat, i al mateix temps, es va analitzar si la mostra seguia sent estable després de ser congelada i descongelada.

Es va realitzar una purificació de les proteïnes TwinStrep-hMLC1 i GlialCAM-3flag provinents de 2 litres de cultiu de cèl·lules en suspensió HEK293 6E. La mostra va ser concentrada a 1,3 mg/mL i es va realitzar una SEC utilitzant la columna *Superdex 200 Increase 10/300 GL* a un flux de 0,3 mL/min. El pic 1 i el pic 2 van ser recollits, congelats amb nitrogen líquid i guardats a -80°C (**figura 67A**). Al cap de 24 hores es va realitzar una SEC dels dos pics per separat utilitzant la columna *Superdex 200 Increase 10/300 GL* a un flux de 0,3 mL/min. Els perfils de SEC, de tots dos pics, no mostraven diferències de mobilitat comparats amb la mostra no congelada (**figura 67B, C i D**).

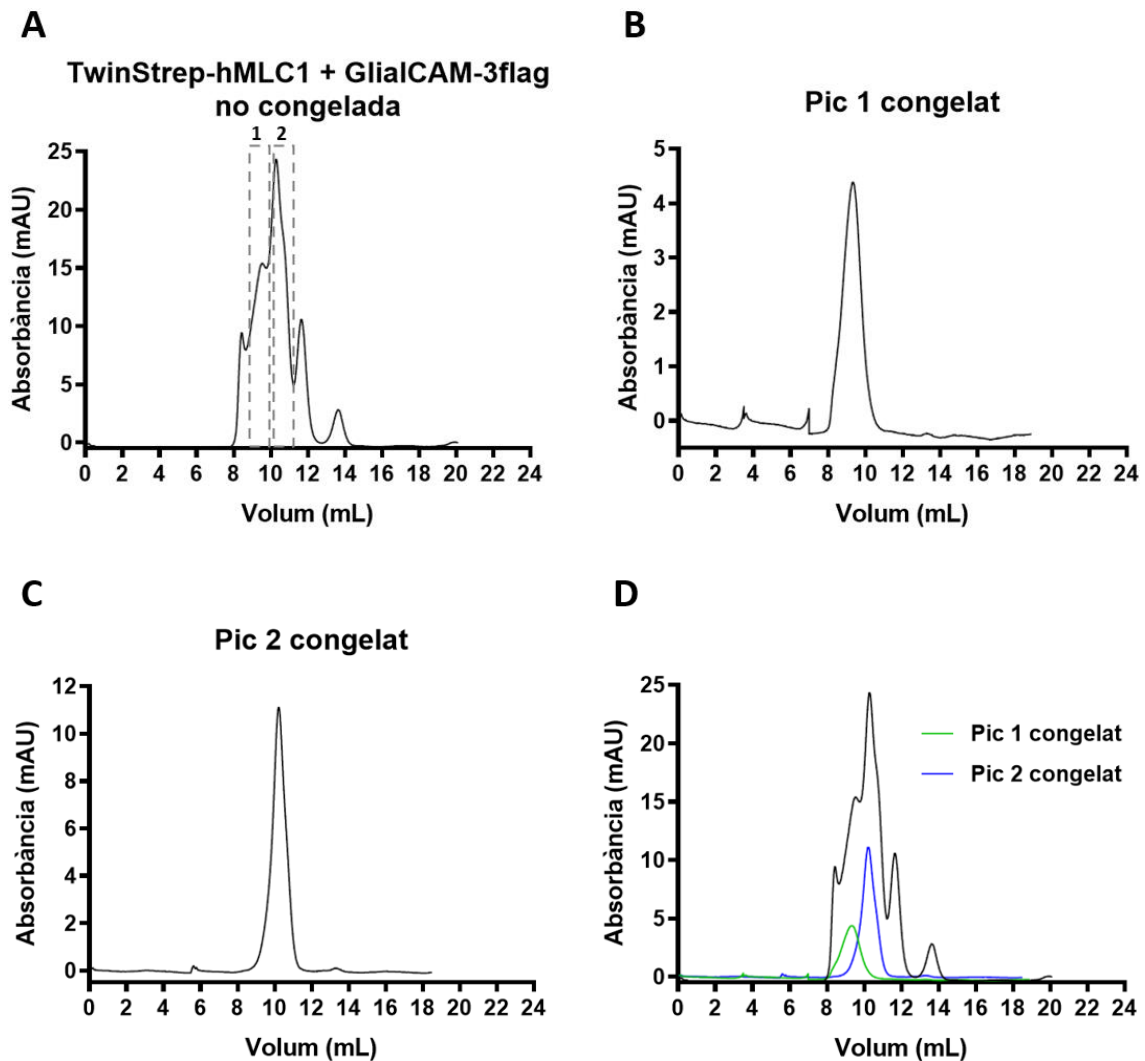
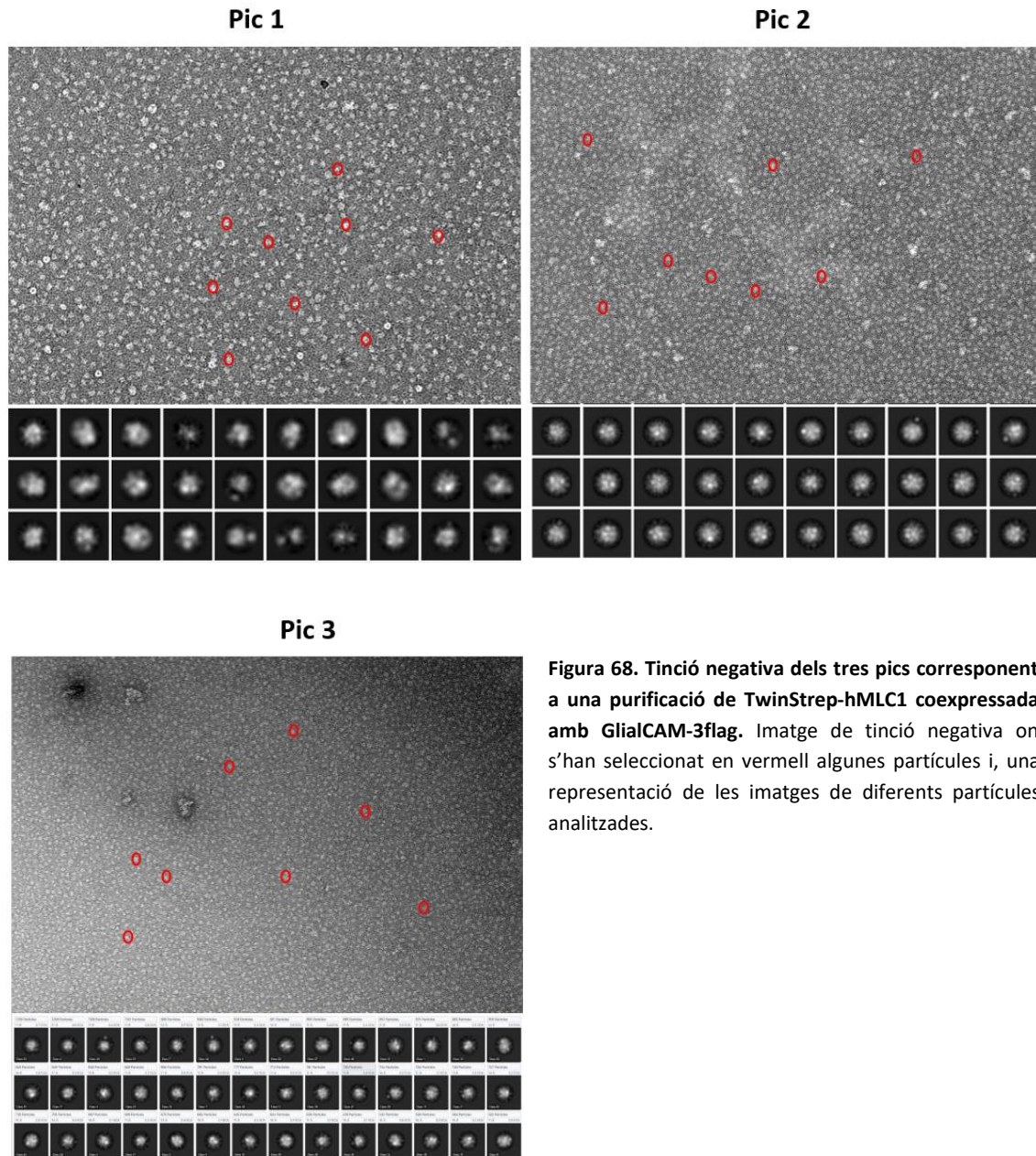


Figura 67. Purificació de la proteïna TwinStrep-hMLC1 coexpressada amb la proteïna GlialCAM-3flag. Perfil de SEC després de purificar la proteïna TwinStrep-hMLC1 coexpressada amb la proteïna GlialCAM-3flag utilitzant digitonina al 2% i la resina Strep-Tactin. **B i C)** Perfil de SEC del pic 1 i el pic 2 després de congelar i descongelar la mostra. **D)** Superposició dels perfils de SEC. En tots els casos la proteïna va córrer a 0,3 mL/min utilitzant la columna *Superdex 200 Increase 10/300 GL* de 25 mL.

Aquests resultats mostraven que els diferents pics observats en el perfil de SEC podien ser col·lectats per separat i que la mostra seguia sent estable després de ser congelada i descongelada.

Els 3 pics van ser enviats al CNIO on es va realitzar un tinció negativa dels tres pics recol·lectats en l'experiment anterior (**figura 68**). La tinció de plata dels tres pics mostraven la presència de partícules amb suficient qualitat per procedir amb la obtenció de imatges per cryo-EM. Per altra banda, en algunes imatges obtingudes del pic 1 s'observava una densitat al voltant de la micel·la, suggerint que correspongués a la regió

extracel·lular de la proteïna GlialCAM. Aquests resultats indicaven la possibilitat d'obtenir micel·les que continguessin el complex MLC1/GlialCAM (pic 1) i micel·les amb la proteïna MLC1 (Pic 2 i pic 3).



Tot seguit, es va realitzar una expressió de 3,5 litres de cultiu de cèl·lules en suspensió HEK293 6E per augmentar la concentració de proteïna obtinguda a cada pic i enviar la mostra al CNIO perquè iniciessin els estudis estructurals per cryo-EM.

La mostra va ser concentrada a 2 mg/mL i es va realitzar una SEC utilitzant la columna *Superdex 200 Increase 10/300 GL* a un flux de 0,3 mL/min. El perfil de SEC mostrava uns pics majoritaris corresponents al *void* a 8 mL i al pic 2 a 11 mL amb uns nivells d'absorbància d'aproximadament 50 mAU. El pic 1 apareixia al voltant dels 9 mL a 40 mAU i el pic 2 al voltant dels 12 mL a 22 mAU. Els pics 1, 2 i 3 van ser recollits, concentrats a 1, 1,75 i 1 mg/mL, respectivament i congelats (**figura 69A**).

Es va realitzar una tinció de plata i un WB de comprovació dels 3 pics. La tinció de plata mostrava una tènue banda al voltant dels 72 kDa que coincidia amb la banda de GlialCAM-3flag detectada per WB, i una banda majoritària al voltant dels 36 kDa que coincidia amb la banda de TwinStrep-hMLC1 detectada per WB. Els anticossos utilitzats per detectar les proteïnes GlialCAM-3flag i TwinStrep-hMLC1 van ser l'anticòs anti-flag i l'anticòs N4 humà, respectivament (**figura 69B**).

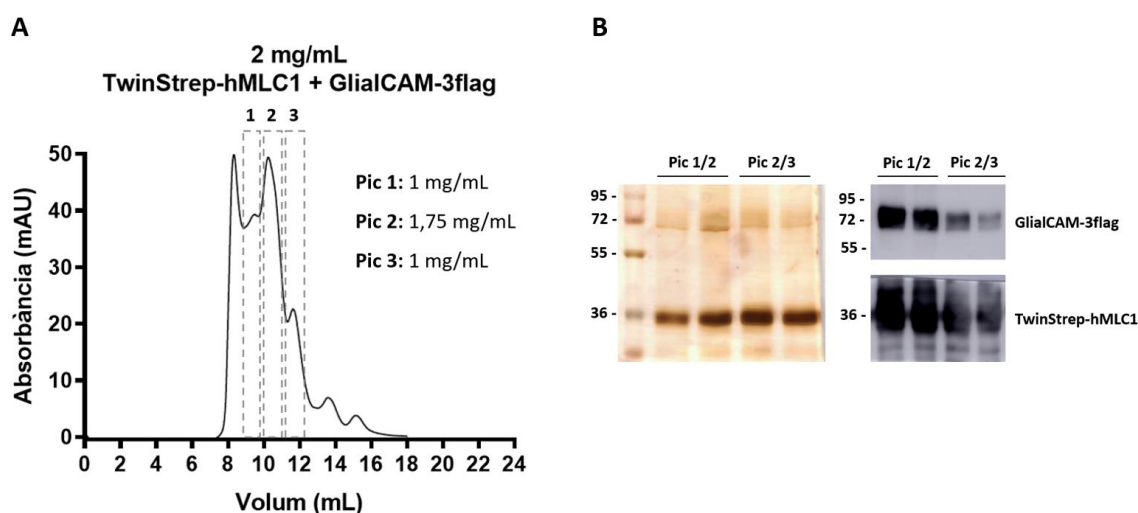


Figura 69. Purificació de la proteïna TwinStrep-hMLC1 coexpressada amb la proteïna GlialCAM-3flag. **A)** Perfil de SEC després de purificar la proteïna TwinStrep-hMLC1 coexpressada amb la proteïna GlialCAM-3flag utilitzant digitonina al 2% i la resina Strep-Tactin. La proteïna va ser injectada a 2 mg/mL a una columna *Superdex 200 Increase 10/300 GL* de 25 mL on va córrer a 0,3 mL/min. Senyalats els pics 1, 2 i 3 els quals van ser concentrats a 1, 1,75 i 1 mg/mL, respectivament. **B)** Tinció de plata i WB dels tres pics recollits de la SEC de la purificació de la proteïna TwinStrep-hMLC1 coexpressada amb la proteïna GlialCAM-3flag. Els anticossos utilitzats per detectar Els anticossos utilitzats en el WB per detectar les proteïnes GlialCAM-3flag i TwinStrep-hMLC1 eren l'anticòs anti-flag i l'anticòs N4 humà, respectivament.

Utilitzant els pics obtinguts en l'anterior purificació, es van preparar reixetes de cryo-EM, i ens vam centrar en la obtenció d'imatges del pic 2, ja que era el pic que presentava major concentració i estudis preliminars de cryo-EM utilitzant el microscopi de 200 Kv

va mostrar la presència d'una densitat extra al voltant de la micel·la (resultats no mostrats), indicant la possibilitat que el pic 2 presentés partícules amb el complex MLC1/GlialCAM.

Amb l'objectiu d'augmentar la resolució de les imatges, es van utilitzar el microscopi de Cryo-EM de 300 kv ubicat a LISCB (de l'anglès *Leicester Institute of Structural and Chemical Biology*) (**figura 70**).

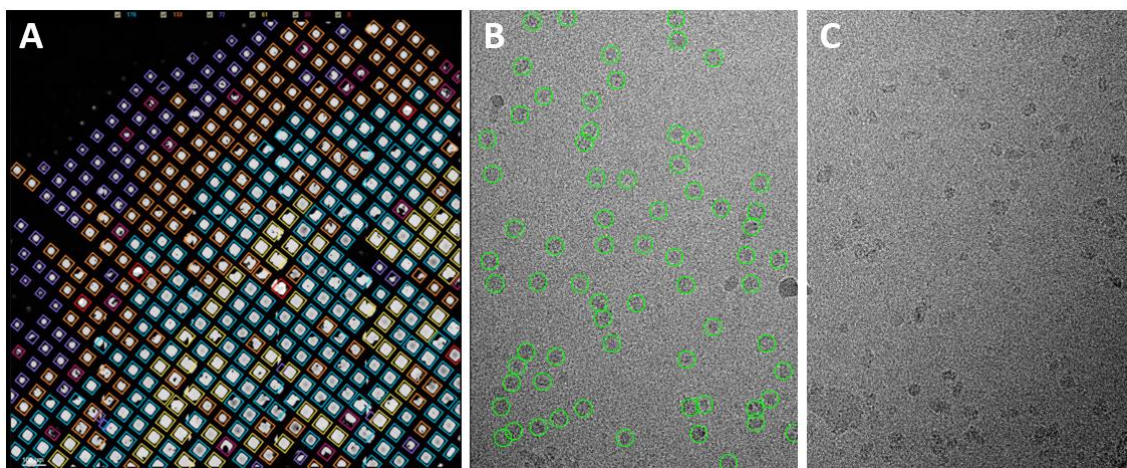
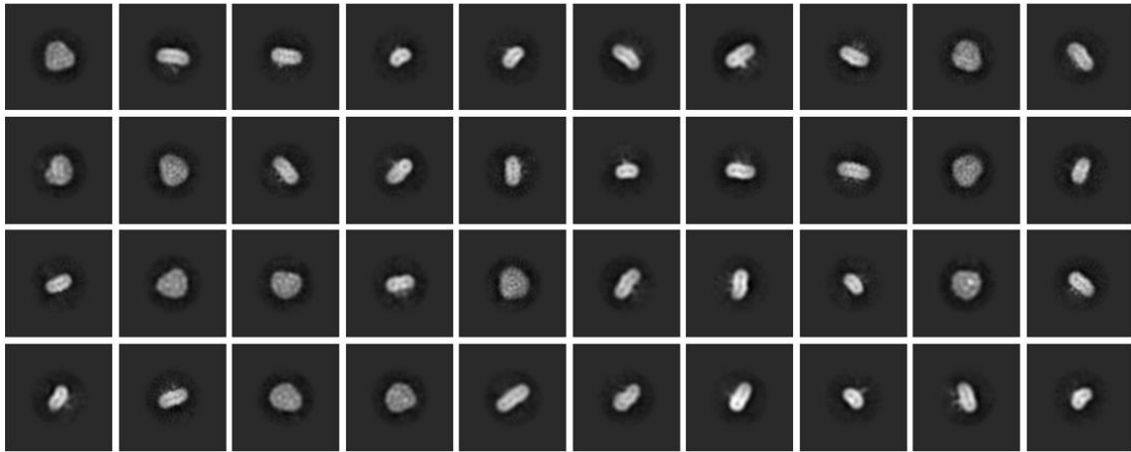


Figura 70. Dades obtingudes en el microscopi de 300 kV de Leicester. **A)** Reixeta de cryo-EM del pic 2 utilitzada per obtenir dades. **B i C)** Representació de les partícules seleccionades encerclades en verd (**B**) i no encerclades (**C**).

La classificació en 2D de les imatges obtingudes va permetre identificar dues poblacions de partícules, una població que presentava una densitat extra al voltant de la micel·la (**figura 71A**) i un altre que no (**figura 71B**). Els estudis preliminars del processament de les imatges corresponents a la població sense densitat extra al voltant de la micel·la, permetien obtenir una representació homogènia de totes les orientacions de les partícules (vista lateral, de la part de baix i de la part de dalt), fet que facilitaria el processament i la resolució de l'estructura. A més, les imatges de les micel·les vistes de dalt mostraven una forma triangular en el seu interior que seria compatible amb el trímer de MLC1 (**figura 71A**). Per altra banda, les imatges obtingudes de la població amb una densitat extra al voltant de la micel·la corresponien únicament al 10% de la població total. Aquests resultats podien ser els esperats degut als baixos nivells de GlialCAM que observàvem en les elucions de la purificació.

A



B

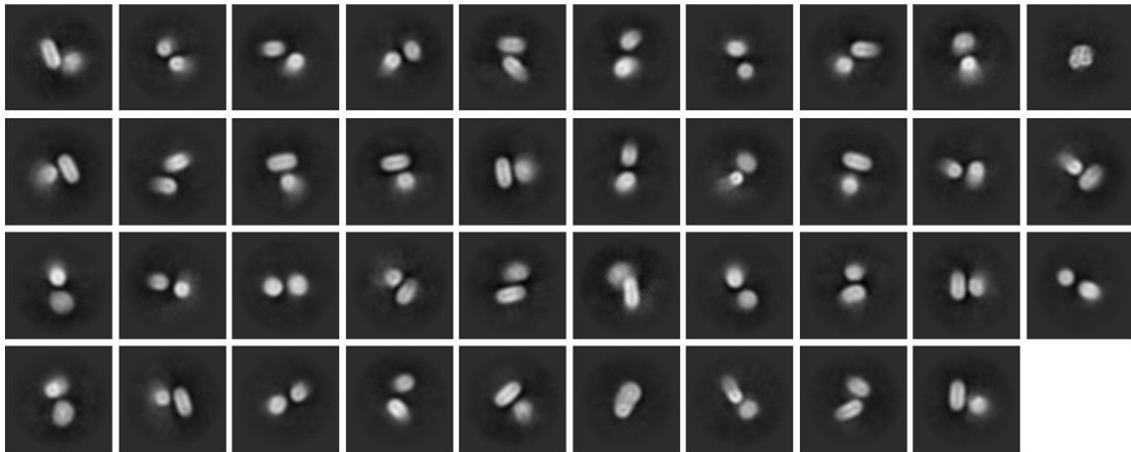


Figura 71. Representació de les imatges 2D de Cryo-EM del pic 2 utilitzant el microscopi de 300 Kv. A) Imatges de la població de partícules que no presenten una densitat extra al voltant de la micel·la. **B)** Imatges de la població de partícules que presenten una densitat extra al voltant de la micel·la. Les imatges s'han obtingut utilitzant el microscopi de Cryo-EM de 300 kV de LISCB (de l'anglès *Leicester Institute of Structural and Chemical Biology*).

Un cop classificades i seleccionades les imatges 2D, es va iniciar la reconstrucció tridimensional dels volums dels diferents grups de partícules obtingudes en 2D, obtenint sis classes de volums 3D. Com mostra la **figura 72**, els volums de color gris i lila corresponien a la població de partícules amb una densitat extra al voltant de la micel·la en les imatges 2D, la qual podria correspondre a la part extracel·lular de la proteïna GlialCAM. Els altres volums (groc, rosa, magenta i cian) corresponen a la població de partícules sense una densitat extra al voltant de la micel·la en les imatges 2D. Per tant, probablement eren micel·les que només presentaven la proteïna MLC1. Per altra banda, els volums groc i magenta mostraven una densitat tubular travessant la micel·la que

serien compatibles amb la presència de dominis transmembrana de proteïna dins la micel·la.

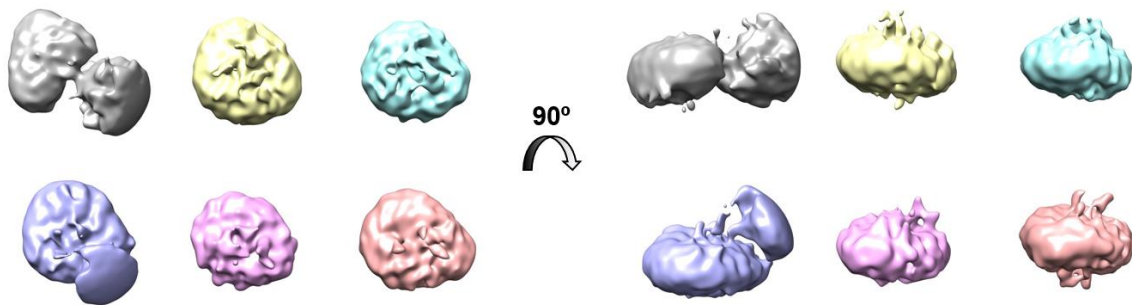


Figura 72. Classificació dels volums 3D obtinguts a partir dels resultats obtinguts en 2D. Imatges de sis classes de volums 3D (cada classe indicada amb un color diferent). Els volums gris i lila corresponen a la població que presenta la densitat extra al voltant de la micel·la. La resta de volums (groc, rosa, magenta i cian) corresponen a micel·les que contenen únicament la proteïna MLC1.

Es van seleccionar les millors classes de partícules per dur a terme una subclassificació que permetés obtenir uns volums amb més resolució. Analitzant aquests volums es van observar unes densitats tubulars que sorgien per sota i per sobre de la micel·la. Aquests resultats podrien correspondre al gran *loop* intracel·lular que presenta la proteïna MLC1 entre els TM 4 i 5. Per altra banda, la zona del mig dels volums mostra una estructura triangular que confirma l'estructura triangular observada en les imatges 2D. Aquests resultats suggereixen que la proteïna MLC1 podria estar formant un trímer (**figura 73**).

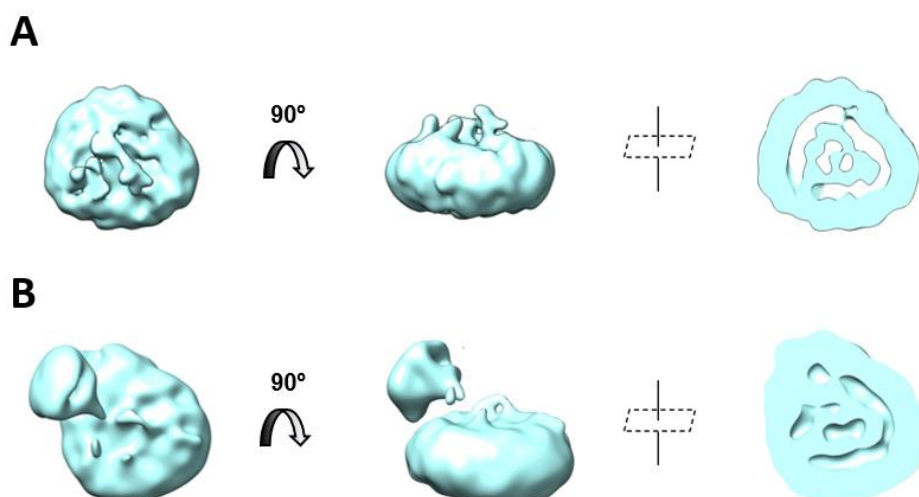


Figura 73. Subclassificació per obtenir volums amb més resolució. Representació del volum 3D de la població sense densitat extra micel·lar (**A**) i amb densitat extra micel·lar (**B**) després de varies repeticions de classificació 3D de la vista des de dalt (esquerra) i lateral (mig). A la dreta, tall transversal del volum 3D per observar possibles estructures de proteïnes.

Finalment, vam utilitzar els models estructurals de les proteïnes MLC1 i GlialCAM predites pel programa *AlphaFold2*, i les vam introduir als volums obtinguts per cryo-EM, amb l'objectiu d'observar si les dimensions dels volums obtinguts coincidien amb les proteïnes MLC1 i GlialCAM (**figura 74**).

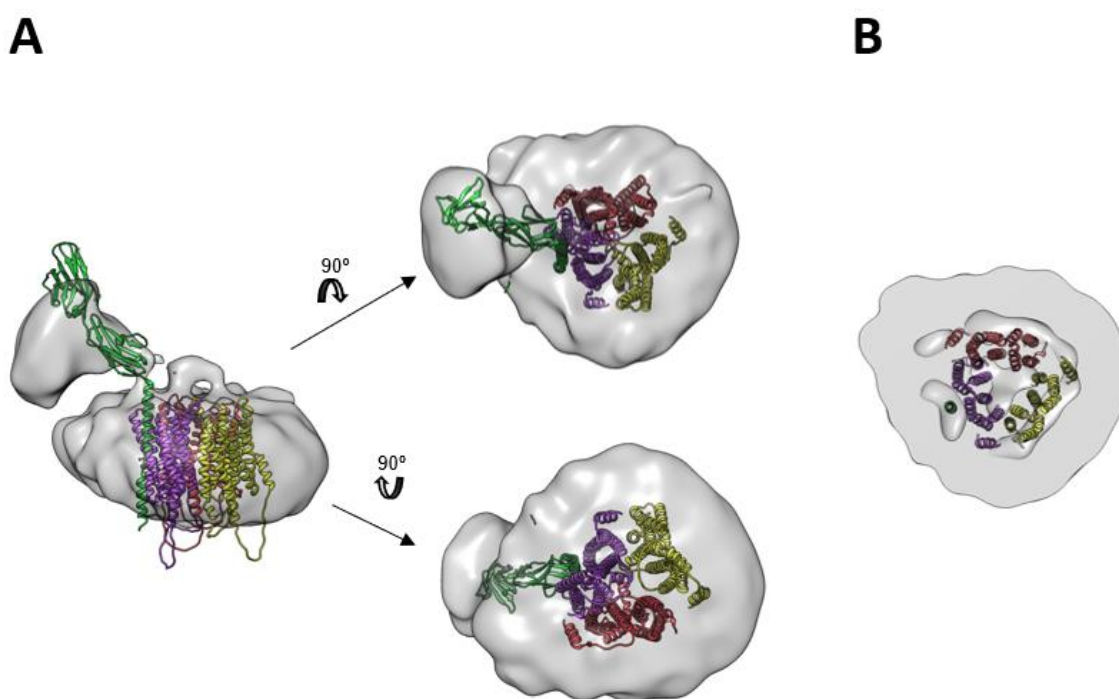


Figura 74. Representació dels volums obtinguts per cryo-EM introduïnt les estructures predites per *AlphaFold2*. A) Volum 3D obtingut per cryo-EM on s'han introduït 3 proteïnes de MLC1 (groga, lila i verda) i una molècula de GlialCAM (verda). B) Tall transversal del volum 3D obtingut per cryo-EM on s'han introduït 3 proteïnes de MLC1 (groga, lila i verda) i una molècula de GlialCAM (verda).

Els resultats obtinguts per cryo-EM són molt prometedors per poder resoldre l'estructura tridimensional del possible trímer de MLC1 i el complex que formen les proteïnes MLC1 i GlialCAM. Actualment, no podem extreure cap conclusió final sobre l'estructura d'ambdues proteïnes, ja que la resolució obtinguda està al voltant dels 12,5-15 Å. Tot i així, estem obtenint més imatges dels diferents pics obtinguts durant la purificació i utilitzant diferents estratègies de processament d'imatges per poder reduir la senyal generada per la micel·la i augmentar la resolució obtinguda.

DISCUSSIÓ

La Leucoencefalopatia Megalencefàlica amb Quists subcorticals (de l'anglès *Megalencephalic Leukoencephalopathy with subcortical Cysts*, MLC) és un tipus de leucodistròfia caracteritzada per la presència de vacuoles en la substància blanca del sistema nerviós (van der Knaap et al., 2012). Els pacients afectats per MLC presenten: macrocefàlia, deteriorament de les funcions motores, atàxia, espasticitat, atacs epilèptics i un lent deteriorament mental (Hamilton et al., 2018). Els gens *MLC1* (Peter A.J. Leegwater et al., 2001) i *GlialCAM* (López-Hernández, Ridder, et al., 2011) són els responsables de MLC, afectant al voltant del 75% i el 20% dels casos, respectivament. No obstant, un nombre reduït de pacients (2%) no presenta mutacions en cap d'aquests dos gens, suggerint que probablement hi ha un altre proteïna responsable de la malaltia.

Els estudis en pacients que presenten mutacions en el gen *GLIALCAM*, han permès descriure dos fenotips diferents de la malaltia MLC (van der Knaap et al., 2012). Un fenotip clàssic, associat a mutacions recessives anomenat MLC2A, i un fenotip benigne, associat a mutacions dominants en el gen anomenat MLC2B. Tot i així, es desconeix quines són les bases moleculars que determinen el comportament recessiu o dominant de les diferents mutacions de la proteïna GlialCAM identificades en els pacients amb fenotip MLC2.

Els resultats obtinguts durant aquesta Tesi han augmentat el coneixement de l'estructura de GlialCAM, permetent entendre les bases moleculars que determinen el comportament hereditari de les diferents mutacions en la proteïna que han estat identificades en els pacients afectats per MLC. A més, s'ha avançat en la resolució de l'estructura tridimensional del complex MLC1/GlialCAM, amb l'objectiu d'entendre les funcions fisiològiques de les dues proteïnes responsables de MLC.

1. APROXIMACIÓ ESTRUCTURAL DE LA PROTEÏNA GLIALCAM.

Els resultats obtinguts en el primer capítol, han permès dissenyar un model estructural de l'homodímer de GlialCAM que explica, per primera vegada, el comportament recessiu o dominant de les mutacions de GlialCAM identificades en pacients MLC2. Aquest model defineix una superfície d'interacció cis, en el domini IgV, que comprèn des de l'àcid glutàmic 86 (E86) fins l'arginina 92 (R92), i una superfície d'interacció *trans*,

formada pels dos *loops* de la zona superior del domini IgV. D'aquesta manera, el comportament dominant de les mutacions és degut a la seva localització i efecteció de la superfície d'interacció cis (mateixa cèl·lula) o trans (diferents cèl·lules) localitzades en el domini IgV. En canvi, les mutacions situades fora de les superfícies d'interacció presenten un comportament recessiu.

Recentment, s'ha alliberat el model estructural generat pel *software AlphaFold2*. Com mostra la **figura 75**, aquest model presenta una elevada similitud amb el model estructural de GlialCAM generat en el laboratori. Aquest fet reforça els resultats obtinguts, que suggereixen que la proteïna GlialCAM dimeritza a través de la superfície d'interacció cis formada des de l'àcid glutàmic 86 (E86) fins l'arginina 92 (R92).

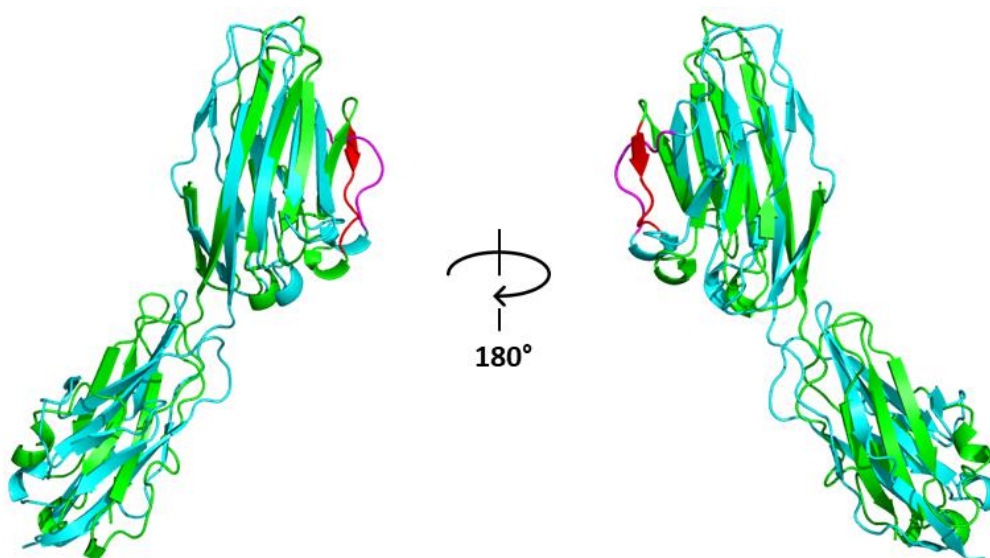


Figura 75. Alineament de la molècula de GlialCAM. En verd, model estructural de la molècula de GlialCAM generada en el laboratori, senyalant en vermell des de l'àcid glutàmic 86 (E86) fins l'arginina 92 (R92). En cian, model estructural de la molècula de GlialCAM generada pel programa *AlphaFold2*, senyalant en magenta des de l'àcid glutàmic 86 (E86) fins l'arginina 92 (R92).

En el segon capítol, es va definir que les dues hèlix α , localitzades en el domini IgC2 de la proteïna GlialCAM, formaven una superfície d'interacció cis entre els diferents homodímers de GlialCAM. Amb aquests resultats, es va generar un model estructural que mostrava, per primera vegada, la possible conformació fisiològica que adoptava la proteïna GlialCAM a la membrana plasmàtica. Les diferents superfícies d'interacció caracteritzades en el primer i el segon capítol d'aquesta Tesi, juntament amb la capacitat que presenta la proteïna GlialCAM de formar interaccions homofílques i heterofílques

a través d'interaccions cis i trans, suggereixen que la proteïna GlialCAM podria estar formant un complex o una estructura en forma de cremallera a les unions cel·lulars, tal com succeeix amb altres IgCAMs, com per exemple: l'*axonin-1/TAG-1* (Freigang et al., 2000), la NCAM (de l'anglès *Neural cell Adhesion Molecule*) (Soroka et al., 2003) o la JAM (de l'anglès *Junctional Adhesion Molecule*) (Kostrewa et al., 2001). Aquestes estructures en forma de cremallera, podrien establir plataformes d'organització de complexes de senyalització o servir com ancoratge de components del citoesquelet (Aricescu & Jones, 2007) (**figura 76**).

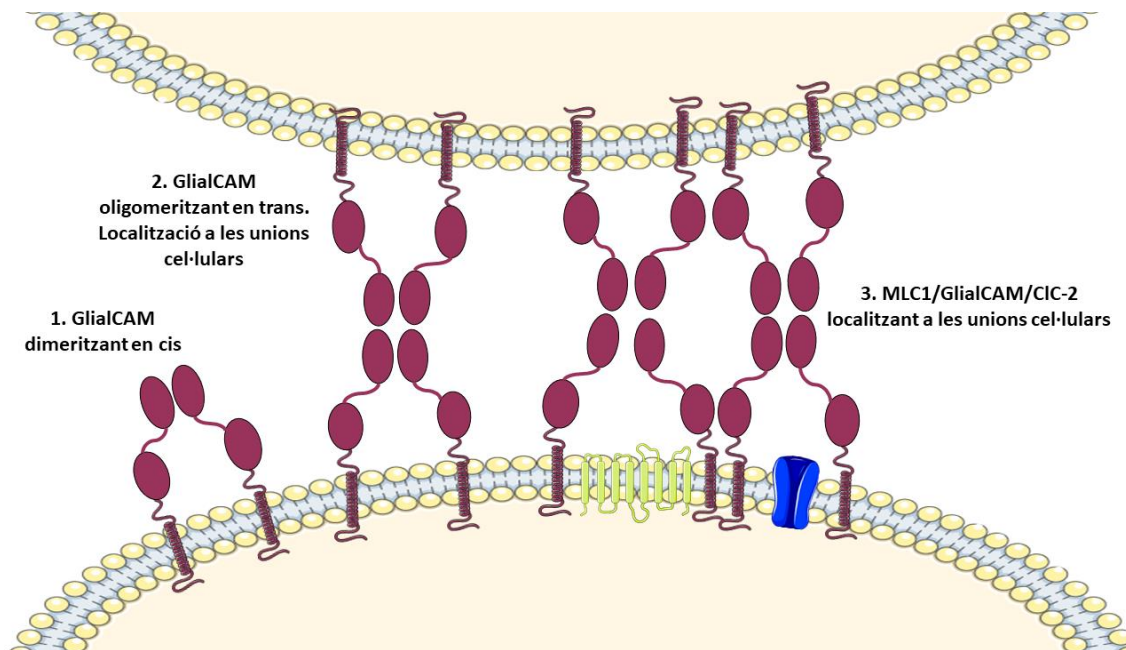


Figura 76. Representació esquemàtica de les interaccions extracel·lulars de la proteïna GlialCAM. Dimerització de dues molècules de GlialCAM a través de la superfície d'interacció cis localitzada en el domini IgV (1). Un cop els dímers de GlialCAM són estables, interaccionen en trans amb els dímers de GlialCAM d'altres cèl·lules (astròcit-astròcit o astròcit-oligodendròcit) (2). Els diferents dímers de GlialCAM podrien estar formant estructures més complexes amb altres molècules de GlialCAM a través de la superfície d'interacció cis localitzada en el domini IgC2. Aquesta configuració seria la proposada a les unions cel·lulars, on es localitzarien les proteïnes MLC1 (verd) i CIC-2 (blau) probablement interaccionant amb el domini IgC2 (3).

Per altra banda, es van estudiar dues mutacions recessives en *GLIALCAM* identificades en pacients afectats per MLC, la serina 196 tirosina (S196Y) i l'aspàrtic 211 asparagina (D211N). Estudis previs del laboratori, no mostraven cap defecte d'homooligomerització ni d'arribada a les unions cel·lulars, únicament mostraven un defecte d'internalització davant la presència de potassi, a diferència de la proteïna WT (Arnedo et al., 2014). Aquests resultats indicaven que la localització del complex MLC1/GlialCAM podria estar

regulada per endocitosi, com ja s'havia suggerit (Lanciotti et al., 2010), i que aquest procés és important per la seva funció fisiològica (Arnedo et al., 2014).

Els estudis realitzats en aquest segon capítol, van definir que les mutacions S196Y i D211N formaven part de les dues hèlix α del domini IgC2 de la proteïna GlialCAM que, com s'ha comentat anteriorment, formaven superfícies d'interacció cis entre els homodímers de GlialCAM. Aquests resultats, juntament amb el defecte d'internalització descrit en les mutacions S196Y i D211N en presència de potassi (Arnedo et al., 2014), suggerien que probablement la interacció cis que es donava a través del domini IgC2 havia de ser una interacció làbil, capaç de trencar-se davant d'un estímul determinat que permetés l'endocitosi de GlialCAM, procés important per dur a terme la seva funció. D'aquesta manera, proposem que el defecte que provocaven els mutants S196Y i D211N és degut a un augment d'estabilitat que impedeix l'endocitosi de la proteïna.

2. RESOLUCIÓ DE L'ESTRUCTURA DEL COMPLEX MLC1/GlialCAM.

La resolució de l'estructura tridimensional (3D) d'una proteïna permet observar la distribució espacial dels diferents aminoàcids que la conformen. D'aquesta manera, s'obté una eina que facilita la interpretació dels diferents resultats obtinguts, i afavoreix a l'explicació de la funció fisiològica de la proteïna d'estudi. Per aquest motiu, un dels objectius d'aquesta Tesi ha estat avançar en la resolució estructural de les proteïnes MLC1 i GlialCAM.

Com s'ha explicat en la introducció, els estudis previs del laboratori mostren que totes dues proteïnes interaccionen entre si formant un complex proteic a les unions cel·lulars (López-Hernández, Ridder, et al., 2011). La proteïna GlialCAM actua com un xaperona per MLC1, protegint-la de la degradació associada al reticle endoplasmàtic (Capdevila-Nortes et al., 2013) i permetent la localització de MLC1 a les unions cel·lulars (López-Hernández, Ridder, et al., 2011; López-Hernández, Sirisi, et al., 2011). Per altra banda, la cotransfecció de GlialCAM amb MLC1, provoca un augment de GlialCAM a les unions cel·lulars (Capdevila-Nortes et al., 2013), suggerint que MLC1 té un paper estabilitzador sobre GlialCAM. Tots aquets resultats suggereixen que la interacció entre ambdues proteïnes és essencial per entendre el seu paper fisiològic. Per tant, l'objectiu final dels

resultats mostrats en el tercer capítol és resoldre l'estructura de les proteïnes MLC1 i GlialCAM, obtenint una eina que faciliti la interpretació dels diferents resultats obtinguts i que afavoreixi la interpretació de les seves funcions fisiològiques.

Els resultats obtinguts estableixen un sistema d'expressió i purificació del complex MLC1/GlialCAM. A més, els experiments de criomicroscòpia electrònica mostren, per primera vegada, imatges preliminars de l'estructura tridimensional (3D) del trímer de MLC1 i del complex MLC1/GlialCAM. No obstant, la resolució de l'estructura es troba encara en una fase inicial, la qual cosa no permet anar més enllà en quant a l'anàlisi estructural.

Malgrat això, recentment s'ha alliberat el model estructural de la proteïna MLC1 generat a partir del *software AlphaFold2*, que permet observar el teòric plegament del monòmer de MLC1 en el qual es distingeixen perfectament els primers quatre TM dels quatre últims (**figura 77A**). Aquest model permet localitzar les diferents característiques estructurals que es van identificar analitzant la seqüència primària. En primer lloc, vam localitzar els motius de varies leucines, localitzats en els TM 4 i 8. Ambdós motius es troben separats entre si dificultant la seva interacció, però la seva orientació cap a l'exterior podria afavorir la interacció amb altres molècules de MLC1.

Inicialment, en l'anàlisi de la seqüència primària de MLC1, no s'observava cap patró de distribució de les diferents mutacions identificades en els pacients afectats per MLC. En canvi, en el model estructural del monòmer de MLC1 s'observa que la majoria de les mutacions es localitzen a la interfase entre les dues meitats de la proteïna (**figura 77A i B**). Aquesta observació suggereix que la interfase entre els dos dominis de MLC1 té un paper bàsic en el correcte plegament de la proteïna i en el *sorting* des del reticle endoplasmàtic fins a la membrana cel·lular. En general, les mutacions de MLC1 causen una retenció en el reticle endoplasmàtic i la degradació en el proteosoma, provocant una disminució dels seus nivells d'expressió i una menor arribada a la membrana plasmàtica (Lanciotti et al., 2010; Montagna et al., 2006; Teijido et al., 2004). La resolució estructural de l'oligòmer de MLC1 o el complex amb GlialCAM, ajudarà a explicar la importància d'aquesta interfase, on es localitzen la majoria de les mutacions.

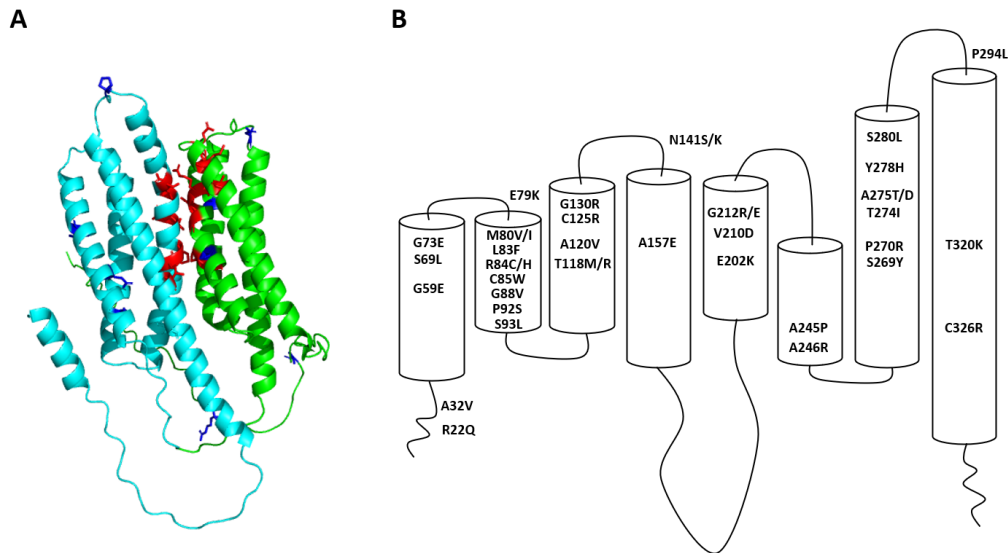


Figura 77. Representació de les diferents mutacions identificades en el gen *MLC1* dels pacients afectats per MLC. **A)** Model estructural del monòmer de MLC1 generat a través del programa AlphaFold2, acolorit en **verd** els quatre primers dominis transmembrana (TM1-4) i en **cian** els quatre últims (TM5-8). Localització de les mutacions en el model estructural de MLC1 generat pel programa AlphaFold2, acolorint en **vermell** aquelles que es situen en la interfase i en **blau** les mutacions que es situen fora. **B)** Representació esquemàtica de les diferents mutacions identificades en el gen *MLC1*.

Aquest model permet observar que el plegament que adquireixen els primers 4 TMs (TM1-TM4) i els 4 últims (TM5-TM8) són molt similars entre si, permetent diferenciar dues estructures, idènticament plegades, unides pel gran *loop* intracel·lular de MLC1 que uneix els TM 4 i 5 (**figura 78**). Aquesta divisió del monòmer en dues estructures amb una elevada similitud de plegament, reforça la hipòtesi que la proteïna MLC1 prové d'una duplicació gènica dels primers quatre TMs.

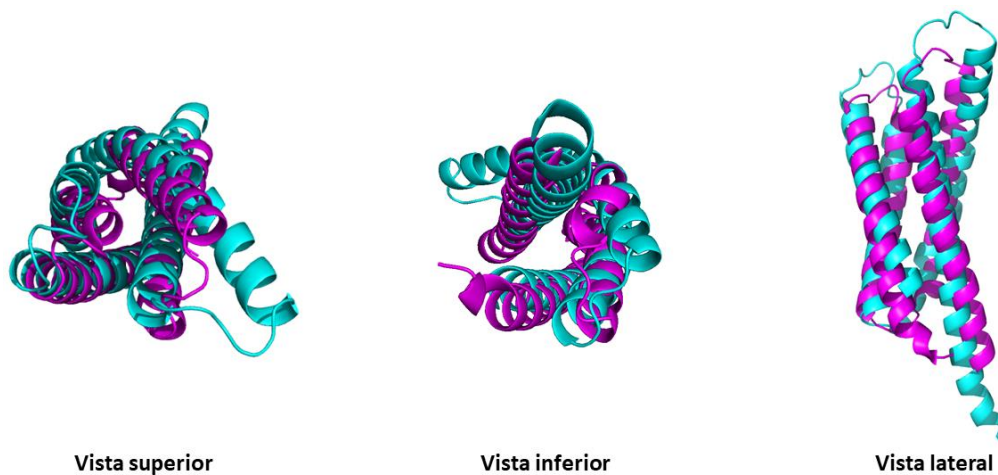


Figura 78. Alineament estructural de les dues parts de la proteïna MLC1. Alineament estructural dels primers quatre segments TM (TM1-4 acolorits en cian) amb els quatre últims segments TM (TM5-8 colorejats en magenta) de la proteïna MLC1.

Com s'ha comentat en la introducció, la seqüència primària de la proteïna MLC1 no mostrava un elevat percentatge d'identitat amb cap proteïna coneguda, únicament mostrava una identitat inferior al 20% amb el canal de potassi kv1.1. Malgrat això, es ben sabut que proteïnes amb identitats de seqüència molt baixa poden mostrar patrons de plegament tridimensional semblants, associats a funcions concretes. En aquest sentit, els transportadors que pertanyen a la superfamília APC (de l'anglès *Amino acids, Polyamines and organoCations*), presenten un mateix plegament estructural anomenat LeuT-fold o APC-fold, tot i compartir només un 10% d'identitat de seqüència entre ells (Edwards et al., 2018). Per tant, la similitud estructural permet que, tot i la baixa identitat de les seves seqüències primàries, realitzin funcions similars (Edwards et al., 2018; Ponzoni et al., 2018). Gràcies a aquest model estructural del monòmer de MLC1, vam poder analitzar quines proteïnes, ja conegudes, presentaven un plegament similar mitjançant el programa PDBe fold (<http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm/>). D'aquesta manera, la identificació de proteïnes amb un plegament similar al de MLC1 podria suggerir un paper fisiològic per MLC1, com succeeix amb les proteïnes de la superfamília APC.

Tenint en compte la similitud de plegament que presenten els primers quatre TM amb els quatre últims, es va realitzar un anàlisi comparatiu de plegament dels primers quatre TMs utilitzant el programa PDBe fold. Les proteïnes obtingudes van ser la proteïna PhoU, encarregada de detectar ions fosfat (Lee et al., 2014) i la proteïna Csp (de l'anglès *Copper storage protein*), encarregada d'emmagatzemar ions de coure (Straw et al., 2019). Ambdues proteïnes són procariotes i solubles; tot i així, l'elevada similitud de plegament (**figura 79A i B**), suggereix que MLC1 ha evolucionat a una proteïna de membrana i que probablement presenti un paper important com a sensora o emmagatzemadora de ions.

En aquest sentit, es va analitzar la similitud de plegament amb la proteïna Kv1.1, ja que era la proteïna que presentava una major homologia de la seqüència primària respecte MLC1. Alineant els primers quatre TM de MLC1 amb la regió sensora de voltatge del canal Kv1.1, s'observava una similitud en el plegament (**figura 79C**). A més, analitzant la seqüència primària de MLC1, s'observen quatre aminoàcids carregats positivament (lisines) altament conservades al final del TM 4. Aquesta característica és similar a les

càrregues positives que presenta la regió del sensor dels canals de potassi dependents de voltatge, localitzats en els segment TM 4 (RXXR) (Kuang et al., 2015).

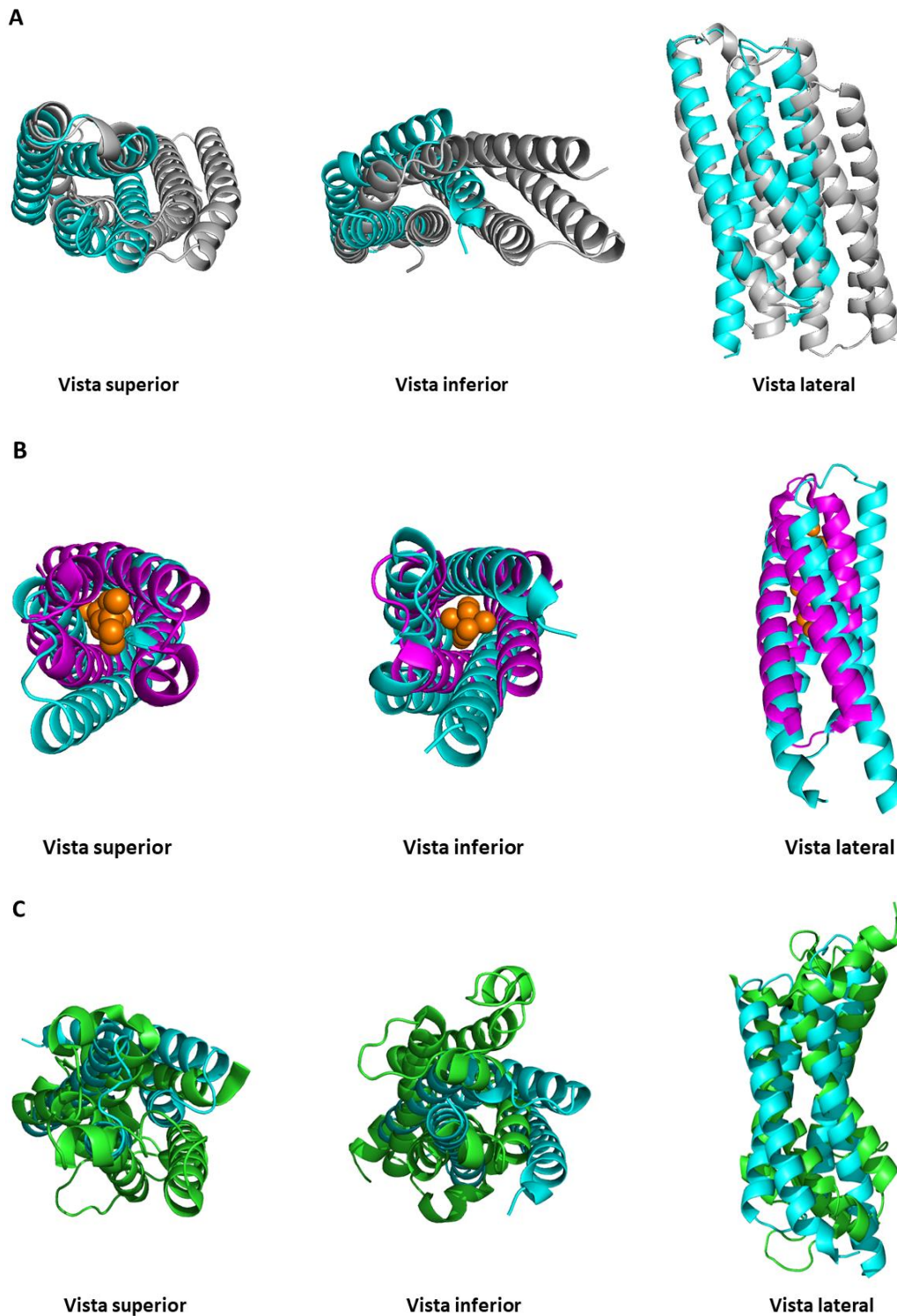


Figura 79. Alineament estructural dels quatre primers TM de la proteïna MLC1 amb el sensor de voltatge, la proteïna PhoU i la proteïna Csp. Representació dels diferents alineaments estructurals dels quatre primers segments transmembrana de la proteïna MLC1 (cian). S'il·lustren els quatre dominis transmembrana que formen el sensor de voltatge del canal de potassi dependent de voltatge (verd) (A), amb la proteïna bacteriana sensora d'ions fosfat PhoU (B), i la proteïna bacteriana captadora de ions coure Csp (C).

Els diferents alineaments del model estructural del monòmer de MLC1, indiquen una similitud de plegament amb proteïnes sensores (proteïna PhoU o regió sensora de voltatge del canal Kv1.1) o emmagatzemadores de ions (proteïna Csp). Aquestes dades suggereixen que MLC1 pateix un canvi conformacional com a resposta als canvis en la concentració de ions. A més, estudis de sobreexpressió de MLC1 en astròcits, mostren la influència de MLC1 sobre proteïnes senyalitzadores, incloent EGFR (de l'anglès *Epidermal Growth Factor Receptor*), ERK1/2, PLC γ 1 i KCa3.1 (Lanciotti et al., 2016).

Totes aquestes dades suggereixen que MLC1 té la capacitat de canviar la seva conformació a partir de canvis en la concentració iònica. Aquests canvis conformacionals podrien modular altres proteïnes o iniciar cascades de senyalització que estiguessin involucrades en la regulació de l'homeòstasi iònica.

Com s'ha comentat en la introducció, les tetraspanines són proteïnes de membrana formades per quatre dominis TM i presenten la capacitat d'homo- i hetero-oligomeritzar (Hemler, 2005). En varis casos, s'ha descrit que formen un complex amb una proteïna amb un únic domini TM que pertany a la superfamília de les Ig, com per exemple: la tetraspanina CD81 que s'associa amb CD19 (Susa et al., 2021) o la tetraspanina CD9 amb EWI-2 (Oosterheert et al., 2020). A més, es poden associar lateralment a la membrana plasmàtica amb una àmplia gamma de proteïnes, modulant les seves funcions i organitzant els diferents compartiments de la membrana; dins d'aquestes proteïnes hi ha els GPCRs (Little et al., 2004).

A nivell estructural, la homologia de la seqüència primària de MLC1 respecte a les tetraspanines és inferior al 20%, i per altra banda, presenta 8 dominis TM. Tot i així, estudis bioquímics indiquen que els quatre dominis TM es poden considerar una duplicació (Bosch & Estévez, 2021). Al igual que aquestes, MLC1 té la capacitat d'oligomeritzar amb si mateixa i formar un complex amb GlialCAM, que és una proteïna amb un únic domini transmembrana i que pertany a la superfamília Ig (López-Hernández, Ridder, et al., 2011), tal i com succeeix amb la tetraspanina CD81 i la proteïna CD19 explicat a la introducció (Zimmerman et al., 2016). Per altra banda, MLC1 influeix directament el trànsit d'altres proteïnes com el canal de clorur CIC-2 (Jeworutzki et al., 2012) i la connexina 43 (M. Wu et al., 2016).

Per tant, encara que es desconeix la funció de MLC1, totes aquestes evidències suggereixen que podria tenir una funció similar a les tetraspanines. Tot i així, es requereix l'estructura 3D del complex MLC1/GlialCAM per confirmar aquesta hipòtesi.

3. MODEL PATOFISIOLÒGIC DE LA MALALTIA MLC.

La malaltia MLC es caracteritza per una inflamació astrocitària que provoca la retenció d'aigua, en forma de vacuoles, localitzades principalment a les beines externes de mielina i als peus astrocitaris. Encara que actualment es desconeixen les funcions de les proteïnes MLC1 i GlialCAM, observant el fenotip vacuolitzant que presenten els pacients afectats per MLC, es suggereix que ambdues proteïnes estan involucrades en la modulació de l'aigua i l'homeòstasi iònica (van der Knaap et al., 2012). Per altra banda, en pacients afectats per MLC també s'han descrit defectes en l'absorció del potassi extracel·lular i un increment de l'excitabilitat neuronal (Dubey et al., 2018).

L'activitat neuronal provoca canvis continus en el flux de ions associats al moviment de l'aigua, els quals necessiten una regulació precisa. Els astròcits són les cèl·lules principals de regular l'homeòstasi en el cervell, formant una xarxa de cèl·lules gials composta per astròcits, oligodendròcits i cèl·lules endodurals interconnectada a través de unions *gap*. Aquesta xarxa permet l'eliminació de l'excés dels ions potassi i de l'aigua a través del procés anomenat tamponament espacial de potassi, on els ions potassi i l'aigua són transportats des de les regions sinàptiques fins el torrent sanguini. Els gradients elèctrics i osmòtics són les forces que permeten aquest procés. Si la funció de les proteïnes que intervenen en aquest procés es veu afectada, es produeix una desregulació de l'homeòstasi iònica que provoca una acumulació d'aigua en els astròcits i en la mielina (van der Knaap et al., 2012).

La nostra hipòtesi és que les proteïnes MLC1 i GlialCAM formen un complex en les unions cel·lulars, on MLC1 actuaria com un sensor de l'augment de potassi extracel·lular, produït possiblement en períodes d'elevada activitat neuronal. La localització de MLC1/GlialCAM, en els petits espais entre astròcit-astròcit i astròcit-oligodendròcit, permetria que petits canvis dels nivells extracel·lulars de potassi es converteixin en grans canvis de concentració, i per tant, fàcilment detectats pel complex GlialCAM/MLC1.

D'aquesta manera, el complex s'anticiparia a la detecció dels canvis del medi. L'augment de potassi extracel·lular provocaria canvis conformacionals en MLC1, que efectarien de manera directa o indirecta a diferents proteïnes implicades en la regulació de l'homeòstasi iònica.

Estudis previs en el grup, van mostrar que davant l'augment de potassi, les proteïnes MLC1, GlialCAM i CIC-2 formen un complex ternari a les unions entre els astròcits, on GlialCAM actuaria com a pont entre MLC1 i CIC-2. El complex MLC1/GlialCAM regula directament el canal de clorur CIC-2, canviant la seva localització a les unions cel·lulars i provocant un canvi del seu índex d'activació i rectificació que permetria l'influx dels ions clorur (Jeworutzki et al., 2012). L'entrada dels ions clorur permetria una major absorció de ions potassi gràcies a la compensació de càrregues.

Per altra banda, es va observar que l'absència de MLC1 i GlialCAM altera l'activitat del canal VRAC (de l'anglès, *Volume-Regulated Anion Channels*) (Capdevila-Nortes et al., 2013). En els astròcits, l'activitat d'aquest canal és essencial per restaurar el volum cel·lular, després de l'activitat neuronal o davant d'un xoc hipotònic, a través d'un mecanisme de regulació del decreixement del volum cel·lular anomenat RVD (de l'anglès *Regulatory Volume Decrease*) (Hoffmann et al., 2009). Com s'ha comentat anteriorment, l'augment de l'activitat neuronal provoca un augment d'entrada de ions dins la cèl·lula, els quals van acompanyats d'una entrada d'aigua. Aquest fet provoca un augment del volum dels astròcits, activant el canal VRAC i permetent l'alliberació de ions clorurs i d'osmòlits, com la taurina i altres molècules que actuen com a neurotransmissors (el glutamat o l'ATP). Aquests estudis van determinar que el complex MLC1/GlialCAM regula de manera indirecta el canal VRAC, ja que la subunitat principal del canal LRRC8A no interacciona ni colocalitza amb les proteïnes MLC1 i GlialCAM (Capdevila-Nortes et al., 2013). La disrupció del canal VRAC causa la formació de vacuoles intracel·lulars degut a l'acumulació d'aigua a l'interior de les cèl·lules. Per tant, un defecte en la funció del canal VRAC podria reduir la capacitat dels astròcits per absorbir potassi, contribuint en el fenotip vacuolitzant observat en els pacients afectats per MLC. El mecanisme de regulació del canal VRAC a través del complex MLC1/GlialCAM és a través de l'activació de vies de senyalització intracel·lulars.

Diferents estudis suggereixen que el complex MLC1/GlialCAM podria estar regulant també altres proteïnes relacionades amb el moviment de ions. Algunes d'aquestes proteïnes podrien estar regulades a través d'una interacció directa amb el complex MLC1/GlialCAM, com el canal CIC-2, la Na⁺/K⁺-ATPase (Brignone et al., 2011), la connexina 43 (M. Wu et al., 2016), o la V-ATPase (Brignone et al., 2014); mentre que altres proteïnes podrien estar regulades indirectament, com el canal VRAC i el canal TRPV4 (Lanciotti et al., 2012). D'aquesta manera, es suggereix que el complex MLC1/GlialCAM podria estar formant una plataforma d'organització, on diferents proteïnes podrien interaccionar o ser regulades a través d'aquesta xarxa de proteïnes. D'aquesta manera, el complex MLC1/GlialCAM podria regular l'homeòstasi iònica, influenciant l'activitat i la interacció amb diferents transportadors i/o canals iònics que podrien estar involucrats en el control dels nivells de potassi del cervell. El fet que varis processos cel·lulars estiguin involucrats, explicaria l'heterogeneïtat observada en el fenotip dels pacients afectats per MLC.

Recentment, s'ha determinat l'interactoma de la proteïna GlialCAM del cervell de ratolí i s'ha analitzat la interacció amb la proteïna MLC1 (Alonso-Gardón et al., 2021). Els resultats de proteòmica van identificar tres GPCR (de l'anglès *G Protein Coupled Receptors*): els GPCR37 i GPCR37L1 acoblats a la proteïna $G\alpha_{i/o}$ que inhibeix l'adenilat ciclasa; i el GPCR orfe GPRC5B, associat a la quinasa Fyn. Aquest estudi mostra una modulació dinàmica entre la interacció de les proteïnes MLC1 i GlialCAM, i els GPCR (Alonso-Gardón et al., 2021). Aquests resultats suggereixen que els GPCR podrien estar involucrats en els processos de senyalització associats prèviament a MLC1 i GlialCAM.

Tenint en compte aquests resultats, proposem que el complex MLC1/GlialCAM tenen una xarxa de proteïnes associades amb les que estarien interaccionant de manera dinàmica i regulant-les, donant lloc a canvis en la seva activitat. La interacció amb alguna d'elles s'estaria donant de manera directe, com per exemple amb el canal CIC-2; mentre que d'altres es donen de manera indirecte, com el canal VRAC. Per altra banda, la identificació dels GPCR com a proteïnes interactores amb el complex MLC1/GlialCAM pot donar resposta al mecanisme regulador dels canals o transportadors mitjançant l'activació de les cascades de senyalització intracel·lulars (**figura 80**).

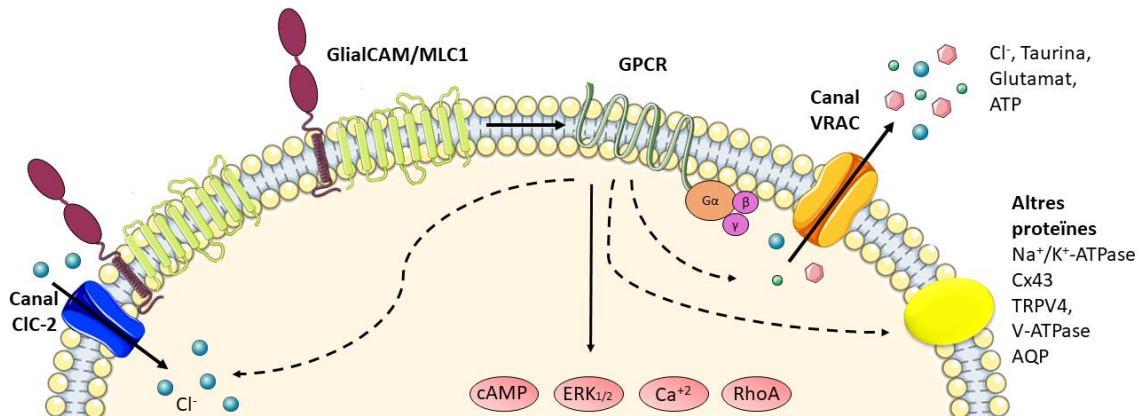


Figura 80. Proposta del model funcional del paper de les diferents proteïnes involucrades en la fisiopatologia de MLC. Suggestim que el complex MLC1/GlialCAM forma un sensor de potassi que, davant de canvis en la concentració extracel·lular dels ions potassi, regula diferents proteïnes involucrades en l'homeòstasi iònica. En cultius primaris d'astròcits s'observa que l'augment d'ions potassi provoca la formació del complex ternari entre MLC1/GLIALCAM/CIC-2 a les unions cel·lulars. Aquesta interacció provoca canvis en l'activitat del canal CIC-2, permetent l'entrada dels ions clorur i compensant les càrregues del potassi. Per altra banda, gràcies a la identificació dels diferents GPCR en l'interactoma de GlialCAM, es suggereix que el complex MLC1/GlialCAM estarien influenciant a diferents proteïnes, com el canal VRAC o altres proteïnes que la seva activitat també es veu alterada com la Na⁺/K⁺ATPase, la connexina 43 (Cx43), la TRPV4, la V-ATPase o la aquoporina (AQP) mitjançant l'activació de les cascades de senyalització intracel·lular.

Degut a la manca de coneixement de la funció fisiològica que desenvolupen les proteïnes MLC1 i GlialCAM, actualment no existeix cap intervenció terapèutica pels pacients afectats per MLC. Tot i així, gràcies a l'avenç del coneixement de la malaltia, s'estan investigant diferents tractaments pels pacients afectats per MLC, com per exemple: la teràpia gènica utilitzant virus adeno-associats proposada per (Bosch & Estévez, 2021) podria ser beneficiosa, com mostra en altres malalties cerebrals (Georgiou et al., 2017); o bé, la utilització de xaperones farmacològiques que podrien restaurar l'expressió de la proteïna MLC1 a la membrana plasmàtica, com succeeix en altres malalties (Verkman & Galletta, 2009).

És important entendre els diferents processos involucrats en la fisiopatologia de la malaltia, amb l'objectiu de dissenyar diferents estratègies terapèutiques pels pacients afectats per aquest tipus de leucodistrofia. La resolució de l'estructura tridimensional de les proteïnes responsables de MLC podria facilitar el coneixement de les seves funcions fisiològiques, permetent desenvolupar mètodes farmacèutics que permetessin restaurar els diferents processos fisiològics que es veuen afectats en la malaltia MLC.

CONCLUSIONS

1. La dimerització en cis entre dues molècules de GlialCAM es produeix a través de la superfície d'interacció, localitzada en el domini IgV, formada per les mateixes superfícies de les làmines β de cada molècula de GlialCAM, que comprenen des del glutamat 86 (E86) fins l'arginina 92 (R92). La conformació d'aquesta superfície d'interacció estaria formada per una atracció electroestàtica en la regió superior a través de l'atracció entre les càrregues negatives del E86 i les càrregues positives de la lisina 68 (K68), i una lleugera repulsió electroestàtica en la regió inferior formada per les càrregues positives de l'arginina 92 (R92) i l'arginina 96 (R96).
2. Les dues hèlix α localitzades en el domini IgC2 de la proteïna GlialCAM permeten la interacció en *cis* dels diferents homodímers de GlialCAM.
3. L'herència recessiva o dominant, de les mutacions del gen *GLIALCAM* identificades en pacients afectats per MLC, dependrà de l'efecte de les superfícies d'interacció del homodímer de GlialCAM. Les diferències observades, entre les diferents mutacions dominants (tipus 1 i 2), és degut a l'efecte de diferents superfícies d'interacció de la proteïna GlialCAM. Les mutacions dominants de tipus 1 estan localitzades a la superfície d'interacció cis del domini IgV, afectant la homooligomerització entre dues molècules de GlialCAM i l'arribada a les unions cel·lulars. Les mutacions dominants de tipus 2 afecten a la superfície d'interacció trans del domini IgV permetent la correcta homooligomerització en cis i afectant la localització a les unions cel·lulars.
4. S'ha definit un sistema d'expressió i purificació tant per la proteïna MLC1 sola com acomplexada amb la proteïna GlialCAM. La qualitat de la proteïna és suficientment bona per realitzar estudis d'electromicroscòpia electrònica (Cryo-EM).

BIBLIOGRAFIA

- Alonso-Gardón, M., Elorza-Vidal, X., Castellanos, A., La Sala, G., Armand-Ugon, M., Gilbert, A., Di Pietro, C., Pla-Casillanis, A., Ciruela, F., Gasull, X., Nunes, V., Martínez, A., Schulte, U., Cohen-Salmon, M., Marazziti, D., & Estévez, R. (2021). Identification of the GlialCAM interactome: the G protein-coupled receptors GPRC5B and GPR37L1 modulate megalencephalic leukoencephalopathy proteins. *Human Molecular Genetics*, *30*(17), 1649–1665. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddab155>
- Alwine, J. C. (1985). Transient gene expression control: effects of transfected DNA stability and trans-activation by viral early proteins. *Molecular and Cellular Biology*, *5*(5), 1034–1042. <https://doi.org/10.1128/mcb.5.5.1034>
- Ambrosini, E., Serafini, B., Lanciotti, A., Tosini, F., Scialpi, F., Psaila, R., Raggi, C., Di Girolamo, F., Petrucci, T. C., & Aloisi, F. (2008). Biochemical characterization of MLC1 protein in astrocytes and its association with the dystrophin-glycoprotein complex. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *37*(3), 480–493. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2007.11.003>
- Aricescu, A. R., & Jones, E. Y. (2007). Immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules: zippers and signals. *Current Opinion in Cell Biology*, *19*(5), 543–550. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.09.010>
- Arnaout, M. A., Mahalingam, B., & Xiong, J. P. (2005). Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *21*, 381–410. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.090704.151217>
- Arnedo, T., López-Hernández, T., Jeworutzki, E., Capdevila-Nortes, X., Sirisi, S., Pusch, M., & Estévez, R. (2014). Functional Analyses of Mutations in HEPACAM Causing Megalencephalic Leukoencephalopathy. *Human Mutation*, *35*(10), 1175–1178. <https://doi.org/10.1002/humu.22622>
- Ashraf, K. U., Josts, I., Mosbahi, K., Kelly, S. M., Byron, O., Smith, B. O., & Walker, D. (2016). The Potassium Binding Protein Kbp Is a Cytoplasmic Potassium Sensor. *Structure*, *24*(5), 741–749. <https://doi.org/10.1016/j.str.2016.03.017>
- Azzarito, V., Long, K., Murphy, N. S., & Wilson, A. J. (2013). Inhibition of α -helix-mediated protein-protein interactions using designed molecules. *Nature Chemistry*, *5*(3), 161–173. <https://doi.org/10.1038/nchem.1568>

- Bai, X. chen, McMullan, G., & Scheres, S. H. W. (2015). How cryo-EM is revolutionizing structural biology. *Trends in Biochemical Sciences*, *40*(1), 49–57.
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.10.005>
- Barczyk, M., Carracedo, S., & Gullberg, D. (2010). Integrins. *Cell and Tissue Research*, *339*(1), 269–280. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0834-6>
- Berditchevski, F., Odintsova, E., Sawada, S., & Gilbert, E. (2002). Expression of the palmitoylation-deficient CD151 weakens the association of $\alpha 3\beta 1$ integrin with the tetraspanin-enriched microdomains and affects integrin-dependent signaling. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(40), 36991–37000.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M205265200>
- Berezin, V., & Walmod, P. (2014). Cell Adhesion Molecules. *Advances in Neurobiology*, vol 8. In *Advances in neurobiology* (Vol. 8).
- Bertocchi, C., Wang, Y., Ravasio, A., Hara, Y., Wu, Y., Sailov, T., Baird, M. A., Davidson, M. W., Zaidel-Bar, R., Toyama, Y., Ladoux, B., Mege, R. M., & Kanchanawong, P. (2017). Nanoscale architecture of cadherin-based cell adhesions. *Nature Cell Biology*, *19*(1), 28–37. <https://doi.org/10.1038/ncb3456>
- Bezanilla, F. (2008). How membrane proteins sense voltage. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *9*(4), 323–332. <https://doi.org/10.1038/nrm2376>
- Biederer, T. (2006). Bioinformatic characterization of the SynCAM family of immunoglobulin-like domain-containing adhesion molecules. *Genomics*, *87*(1), 139–150. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2005.08.017>
- Blanz, J., Schweizer, M., Auberson, M., Maier, H., Muenscher, A., Hübner, C. A., & Jentsch, T. J. (2007). Leukoencephalopathy upon disruption of the chloride channel *ClC-2*. *Journal of Neuroscience*, *27*(24), 6581–6589.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0338-07.2007>
- Blattner, R., Von Moers, A., Leegwater, P. A. J., Hanefeld, F. A., Van der Knaap, M. S., & Köhler, W. (2003). Clinical and genetic heterogeneity in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (MLC). *Neuropediatrics*, *34*(4), 215–218. <https://doi.org/10.1055/s-2003-42210>
- Bonifacino, J. S., & Dell’Angelica, E. C. (1999). Molecular bases for the recognition of tyrosine-based sorting signals. *Journal of Cell Biology*, *145*(5), 923–926.
<https://doi.org/10.1083/jcb.145.5.923>

- Boor, P. K. I., De Groot, K., Waisfisz, Q., Kamphorst, W., Oudejans, C. B. M., Powers, J. M., Pronk, J. C., Scheper, G. C., & Van Der Knaap, M. S. (2005). MLC1: A novel protein in distal astroglial processes. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *64*(5), 412–419. <https://doi.org/10.1093/jnen/64.5.412>
- Bosch, A., & Estévez, R. (2021). Megalencephalic Leukoencephalopathy: Insights Into Pathophysiology and Perspectives for Therapy. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *14*(January), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.627887>
- Breiding, M. J. (2014). The molecular constituents of the blood-brain barrier. *Physiology & Behavior*, *63*(8), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2015.08.003>.The
- Brignone, M. S., Lanciotti, A., Camerini, S., De Nuccio, C., Petrucci, T. C., Visentinand, S., & Ambrosini, E. (2015). MLC1 protein: A likely link between leukodystrophies and brain channelopathies. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *9*(APR), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00106>
- Brignone, M. S., Lanciotti, A., Macioce, P., Macchia, G., Gaetani, M., Aloisi, F., Petrucci, T. C., & Ambrosini, E. (2011). The β 1 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. *Human Molecular Genetics*, *20*(1), 90–103. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq435>
- Brignone, M. S., Lanciotti, A., Visentin, S., De Nuccio, C., Molinari, P., Camerini, S., Diociaiuti, M., Petrini, S., Minnone, G., Crescenzi, M., Laudiero, L. B., Bertini, E., Petrucci, T. C., & Ambrosini, E. (2014). Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts protein-1 modulates endosomal pH and protein trafficking in astrocytes: Relevance to MLC disease pathogenesis. *Neurobiology of Disease*, *66*, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.02.003>
- Cameron, S., & McAllister, A. K. (2018). Immunoglobulin-like receptors and their impact on wiring of brain synapses. *Annual Review of Genetics*, *52*, 567–590. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120417-031513>
- Cao, Y. (2019). Advances in Membrane Proteins. In *Advances in Membrane Proteins*. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-9077-7>

- Capdevila-Nortes, X., Jeworutzki, E., Elorza-Vidal, X., Barrallo-Gimeno, A., Pusch, M., & Estévez, R. (2015). Structural determinants of interaction, trafficking and function in the CIC-2/MLC1 subunit GlialCAM involved in leukodystrophy. *Journal of Physiology*, *593*(18), 4165–4180. <https://doi.org/10.1113/JP270467>
- Capdevila-Nortes, X., López-Hernández, T., Apaja, P. M., de Heredia, M. L., Sirisi, S., Callejo, G., Arnedo, T., Nunes, V., Lukacs, G. L., Gasull, X., & Estévez, R. (2013). Insights into MLC pathogenesis: GlialCAM is an MLC1 chaperone required for proper activation of volume-regulated anion currents. *Human Molecular Genetics*, *22*(21), 4405–4416. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt290>
- Capdevila-Nortes, X., López-Hernández, T., Ciruela, F., & Estévez, R. (2012). A modification of the split-tobacco etch virus method for monitoring interactions between membrane proteins in mammalian cells. *Analytical Biochemistry*, *423*(1), 109–118. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.01.022>
- Cavallaro, U., & Dejana, E. (2011). Adhesion molecule signalling: Not always a sticky business. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *12*(3), 189–197. <https://doi.org/10.1038/nrm3068>
- Chaea, P. S., Ranad, S. G. F. R. R. R., Gotfryde, K., Krusec, A. C., Manglikc, A., Choa, K. H., Nurvaf, S., Gethere, U., Guanf, L., Lolande, C. J., Byrned, B., Kobilkac, B. K., & Gellman, S. H. (2008). A New Class of Amphiphiles Bearing Rigid Hydrophobic Groups for Solubilization and Stabilization of Membrane Proteins. *Chemistry*, *141*(4), 520–529. <https://doi.org/10.1002/chem.201200069.A>
- Charrin, S., Manié, S., Oualid, M., Billard, M., Boucheix, C., & Rubinstein, E. (2002). Differential stability of tetraspanin/tetraspanin interactions: Role of palmitoylation. *FEBS Letters*, *516*(1–3), 139–144. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02522-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02522-X)
- Chattopadhyay, A., & Harikumar, K. G. (1996). Dependence of critical micelle concentration of a zwitterionic detergent on ionic strength: Implications in receptor solubilization. *FEBS Letters*, *391*(1–2), 199–202. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00733-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00733-8)

- Chen, J. C., Lo, Y. F., Lin, Y. W., Lin, S. H., Huang, C. L., & Cheng, C. J. (2019). WNK4 kinase is a physiological intracellular chloride sensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(10), 4502–4507. <https://doi.org/10.1073/pnas.1817220116>
- Christopherson, K. S., Ullian, E. M., Stokes, C. C. A., Mallowney, C. E., Hell, J. W., Agah, A., Lawler, J., Mosher, D. F., Bornstein, P., & Barres, B. A. (2005). Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell*, *120*(3), 421–433. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.020>
- Connor, S. A., Ammendrup-Johnsen, I., Chan, A. W., Kishimoto, Y., Murayama, C., Kurihara, N., Tada, A., Ge, Y., Lu, H., Yan, R., LeDue, J. M., Matsumoto, H., Kiyonari, H., Kirino, Y., Matsuzaki, F., Suzuki, T., Murphy, T. H., Wang, Y. T., Yamamoto, T., & Craig, A. M. (2016). Altered Cortical Dynamics and Cognitive Function upon Haploinsufficiency of the Autism-Linked Excitatory Synaptic Suppressor MDGA2. *Neuron*, *91*(5), 1052–1068. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.08.016>
- Costello, D. J., Eichler, A. F., & Eichler, F. S. (2009). Leukodystrophies classification, diagnosis, and treatment. *Neurologist*, *15*(6), 319–328. <https://doi.org/10.1097/NRL.0b013e3181b287c8>
- Covino, R., Hummer, G., & Ernst, R. (2018). Integrated Functions of Membrane Property Sensors and a Hidden Side of the Unfolded Protein Response. *Molecular Cell*, *71*(3), 458–467. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.07.019>
- Dong, X., Xu, F., Gong, Y., Gao, J., Lin, P., Chen, T., Peng, Y., Qiang, B., Yuan, J., Peng, X., & Rao, Z. (2006). Crystal structure of the V domain of human nectin-like molecule-1/syncam3/ Tsl1/Igsf4b, a neural tissue-specific immunoglobulin-like cell-cell adhesion molecule. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(15), 10610–10617. <https://doi.org/10.1074/jbc.M513459200>
- Doyle, D. A., Cabral, J. M., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., & MacKinnon, R. (1998). The structure of the potassium channel: Molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*, *280*(5360), 69–77. <https://doi.org/10.1126/science.280.5360.69>

- Duarri, A., Lopez de Heredia, M., Capdevila-Nortes, X., Ridder, M. C., Montolio, M., López-Hernández, T., Boor, I., Lien, C. F., Hagemann, T., Messing, A., Gorecki, D. C., Scheper, G. C., Martínez, A., Nunes, V., van der Knaap, M. S., & Estévez, R. (2011). Knockdown of MLC1 in primary astrocytes causes cell vacuolation: A MLC disease cell model. *Neurobiology of Disease*, *43*(1), 228–238. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.03.015>
- Duarri, A., Teijido, O., López-Hernández, T., Scheper, G. C., Barriere, H., Boor, I., Aguado, F., Zorzano, A., Palacín, M., Martínez, A., Lukacs, G. L., van der Knaap, M. S., Nunes, V., & Estévez, R. (2008). Molecular pathogenesis of megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: Mutations in MLC1 cause folding defects. *Human Molecular Genetics*, *17*(23), 3728–3739. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn269>
- Dubey, M., Brouwers, E., Hamilton, E. M. C., Stiedl, O., Bugiani, M., Koch, H., Kole, M. H. P., Boschert, U., Wykes, R. C., Mansvelder, H. D., van der Knaap, M. S., & Min, R. (2018). Seizures and disturbed brain potassium dynamics in the leukodystrophy megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Annals of Neurology*, *83*(3), 636–649. <https://doi.org/10.1002/ana.25190>
- Dubey, M., Bugiani, M., Ridder, M. C., Postma, N. L., Brouwers, E., Polder, E., Gerbren Jacobs, J., Baayen, J. C., Klooster, J., Kamermans, M., Aardse, R., De Kock, C. P. J., Dekker, M. P., Van Weering, J. R. T., Heine, V. M., Abbink, T. E. M., Scheper, G. C., Boor, I., Lodder, J. C., ... Van Der Knaap, M. S. (2015). Mice with megalencephalic leukoencephalopathy with cysts: A developmental angle. *Annals of Neurology*, *77*(1), 114–131. <https://doi.org/10.1002/ana.24307>
- Ebnet, K. (2017). Junctional adhesion molecules (JAMs): Cell adhesion receptors with pleiotropic functions in cell physiology and development. *Physiological Reviews*, *97*(4), 1529–1554. <https://doi.org/10.1152/physrev.00004.2017>
- Edwards, N., Anderson, C. M. H., Conlon, N. J., Watson, A. K., Hall, R. J., Cheek, T. R., Embley, T. M., & Thwaites, D. T. (2018). Resculpting the binding pocket of APC superfamily LeuT-fold amino acid transporters. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *75*(5), 921–938. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2677-8>

- Einheber, S., Pierce, J. P., Chow, D., Znamensky, V., Schnapp, L. M., & Milner, T. A. (2001). Dentate hilar mossy cells and somatostatin-containing neurons are immunoreactive for the $\alpha 8$ integrin subunit: Characterization in normal and kainic acid-treated rats. *Neuroscience*, *105*(3), 619–638. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(01\)00205-6](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00205-6)
- Elegheert, J., Cvetkovska, V., Clayton, A. J., Heroven, C., Vennekens, K. M., Smukowski, S. N., Regan, M. C., Jia, W., Smith, A. C., Furukawa, H., Savas, J. N., de Wit, J., Begbie, J., Craig, A. M., & Aricescu, A. R. (2017). Structural Mechanism for Modulation of Synaptic Neuroligin-Neurexin Signaling by MDGA Proteins. *Neuron*, *95*(4), 896-913.e10. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.07.040>
- Elorza-Vidal, X., Xicoy-Espauella, E., Pla-Casillanis, A., Alonso-Gardón, M., Gaitán-Peñas, H., Engel-Pizcueta, C., Fernández-Recio, J., & Estévez, R. (2020). Structural basis for the dominant or recessive character of GLIALCAM mutations found in leukodystrophies. *Human Molecular Genetics*, *29*(7), 1107–1120. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddaa009>
- Escola, J. M., Kleijmeer, M. J., Stoorvogel, W., Griffith, J. M., Yoshie, O., & Geuze, H. J. (1998). Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(32), 20121–20127. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.32.20121>
- 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., & Nunes, V. (2018). Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: A personal biochemical retrospective. *European Journal of Medical Genetics*, *61*(1), 50–60. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2017.10.013>
- Excoffon, K.J.D.A., R. Bowers, J., Sharma, P. (2014). Alternative splicing of viral receptors: A review of the diverse morphologies and physiologies of adenoviral receptors. *Bone*, *23*(1), 1–7. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>

- Favre-Kontula, L., Rolland, A., Bernasconi, L., Karmirantzou, M., Power, C., Antonsson, B., & Boschert, U. (2008). GlialCAM, an immunoglobulin-like cell adhesion molecule is expressed in glial cells of the central nervous system. *Glia*, *56*(6), 633–645. <https://doi.org/10.1002/glia.20640>
- Fiedorczuk, K., Letts, J. A., Degliesposti, G., Kaszuba, K., Skehel, M., & Sazanov, L. A. (2016). Atomic structure of the entire mammalian mitochondrial complex I. *Nature*, *538*(7625), 406–410. <https://doi.org/10.1038/nature19794>
- Freestyle, S., & Cell, A. (n.d.). *FreeStyle™ F17 Expression Medium*.
- Freigang, J., Proba, K., Leder, L., Diederichs, K., Sonderegger, P., & Welte, W. (2000). The crystal structure of the ligand binding module of axonin-1/TAG-1 suggests a zipper mechanism for neural cell adhesion. *Cell*, *101*(4), 425–433. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80852-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80852-1)
- Gangwar, S. P., Zhong, X., Seshadrinathan, S., Chen, H., Machius, M., & Rudenko, G. (2017). Molecular Mechanism of MDGA1: Regulation of Neuroligin 2:Neurexin Trans-synaptic Bridges. *Neuron*, *94*(6), 1132-1141.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.06.009>
- Georgiou, E., Sidiropoulou, K., Richter, J., Papaneophytou, C., Sargiannidou, I., Kagiava, A., Von Jonquieres, G., Christodoulou, C., Klugmann, M., & Kleopa, K. A. (2017). Gene therapy targeting oligodendrocytes provides therapeutic benefit in a leukodystrophy model. *Brain*, *140*(3), 599–616. <https://doi.org/10.1093/brain/aww351>
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., & Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *Journal of General Virology*, *36*(1), 59–72. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-36-1-59>
- Grieben, M., Pike, A. C. W., Shintre, C. A., Venturi, E., El-Ajouz, S., Tessitore, A., Shrestha, L., Mukhopadhyay, S., Mahajan, P., Chalk, R., Burgess-Brown, N. A., Sitsapesan, R., Huiskonen, J. T., & Carpenter, E. P. (2017). Structure of the polycystic kidney disease TRP channel Polycystin-2 (PC2). *Nature Structural and Molecular Biology*, *24*(2), 114–122. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3343>
- Grisshammer, R. (2009). Chapter 36 Purification of Recombinant G-Protein-Coupled Receptors. *Methods in Enzymology*, *463*(C), 631–645. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63036-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63036-6)

- Hamilton, E. M. C., Tekturk, P., Cialdella, F., Van Rappard, Di. F., Wolf, N. I., Yalcinkaya, C., Çetinçelik, Ü., Rajaei, A., Kariminejad, A., Paprocka, J., Yapici, Z., Bošnjak, V. M., & Van Der Knaap, M. S. (2018). Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: Characterization of disease variants. *Neurology*, *90*(16), E1395–E1403. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000005334>
- Healthcare, G. E. (2018). Size Exclusion Chromatography: Principles and Methods. *GE Healthcare*, 1–122. <https://cdn.gelifesciences.com/dmm3bwsv3/AssetStream.aspx?mediaformatid=10061&destinationid=10016&assetid=11639>
- Hemler, M. E. (2001). Specific tetraspanin functions. *Journal of Cell Biology*, *155*(7), 1103–1107. <https://doi.org/10.1083/jcb.200108061>
- Hemler, M. E. (2005). Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *6*(10), 801–811. <https://doi.org/10.1038/nrm1736>
- 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., Estévez, R., & Jentsch, T. J. (2014). Disrupting MLC1 and GlialCAM and ClC-2 interactions in leukodystrophy entails glial chloride channel dysfunction. *Nature Communications*, *5*. <https://doi.org/10.1038/ncomms4475>
- Hoffmann, E. K., Lambert, I. H., & Pedersen, S. F. (2009). Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiological Reviews*, *89*(1), 193–277. <https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2007>
- Jeworutzki, E., López-Hernández, T., Capdevila-Nortes, X., Sirisi, S., Bengtsson, L., Montolio, M., Zifarelli, G., Arnedo, T., Müller, C. S., Schulte, U., Nunes, V., Martínez, A., Jentsch, T. J., Gasull, X., Pusch, M., & Estévez, R. (2012). GlialCAM, a Protein Defective in a Leukodystrophy, Serves as a ClC-2 Cl⁻ Channel Auxiliary Subunit. *Neuron*, *73*(5), 951–961. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.12.039>
- Jura, N., Zhang, X., Endres, N. F., Seeliger, M. A., Schindler, T., & Kuriyan, J. (2011). Catalytic Control in the EGF Receptor and Its Connection to General Kinase Regulatory Mechanisms. *Molecular Cell*, *42*(1), 9–22. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.03.004>

- Kalipatnapu, S., & Chattopadhyay, A. (2005). Membrane protein solubilization: Recent advances and challenges in solubilization of serotonin1A receptors. *IUBMB Life*, 57(7), 505–512. <https://doi.org/10.1080/15216540500167237>
- Kamiguchi, H., & Lemmon, V. (2000). IgCAMs: Bidirectional signals underlying neurite growth. *Current Opinion in Cell Biology*, 12(5), 598–605. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(00\)00138-1](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(00)00138-1)
- Kasimova, M. A., Lindahl, E., & Delemotte, L. (2018). Determining the molecular basis of voltage sensitivity in membrane proteins. *Journal of General Physiology*, 215(10), 1444–1458. <https://doi.org/10.1085/jgp.201812086>
- Kawate, T., & Gouaux, E. (2006). Fluorescence-Detection Size-Exclusion Chromatography for Precrystallization Screening of Integral Membrane Proteins. *Structure*, 14(4), 673–681. <https://doi.org/10.1016/j.str.2006.01.013>
- Kim, D. M., & Nimigeon, C. M. (2016). Voltage-gated potassium channels: A structural examination of selectivity and gating. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(5), 1–19. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029231>
- Korchowiec, B., Janikowska-Sagan, M., Kwiecińska, K., Stachowicz-Kuśnierz, A., & Korchowiec, J. (2021). The role of cholesterol in membrane activity of digitonin: Experimental and theoretical model studies. *Journal of Molecular Liquids*, 323. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.114598>
- Kostrewa, D., Brockhaus, M., D’Arcy, A., Dale, G. E., Nelboeck, P., Schmid, G., Mueller, F., Bazzoni, G., Dejana, E., Bartfai, T., Winkler, F. K., & Hennig, M. (2001). X-ray structure of junctional adhesion molecule: Structural basis for homophilic adhesion via a novel dimerization motif. *EMBO Journal*, 20(16), 4391–4398. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.16.4391>
- Kuang, Q., Purhonen, P., & Hebert, H. (2015). Structure of potassium channels. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(19), 3677–3693. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1948-5>
- Lanciotti, A., Brignone, M. S., Camerini, S., Serafini, B., Macchia, G., Raggi, C., Molinari, P., Crescenzi, M., Musumeci, M., Sargiacomo, M., Aloisi, F., Petrucci, T. C., & Ambrosini, E. (2010). MLC1 trafficking and membrane expression in astrocytes: Role of caveolin-1 and phosphorylation. *Neurobiology of Disease*, 37(3), 581–595. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.11.008>

- Lanciotti, A., Brignone, M. S., Molinari, P., Visentin, S., De Nuccio, C., Macchia, G., Aiello, C., Bertini, E., Aloisi, F., Petrucci, T. C., & Ambrosini, E. (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. *Human Molecular Genetics*, *21*(10), 2166–2180. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds032>
- Lanciotti, A., Brignone, M. S., Visentin, S., De Nuccio, C., Catacuzzeno, L., Mallozzi, C., Petrini, S., Caramia, M., Veroni, C., Minnone, G., Bernardo, A., Franciolini, F., Pessia, M., Bertini, E., Petrucci, T. C., & Ambrosini, E. (2016). Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts protein-1 regulates epidermal growth factor receptor signaling in astrocytes. *Human Molecular Genetics*, *25*(8), 1543–1558. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw032>
- Lay, H. L., Mei, C. M., Zhang, T., & Shen, S. (2009). The immunoglobulin-like cell adhesion molecule HepaCAM induces differentiation of human glioblastoma U373-MG cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, *107*(6), 1129–1138. <https://doi.org/10.1002/jcb.22215>
- Lee, S. J., Park, Y. S., Kim, S. J., Lee, B. J., & Suh, S. W. (2014). Crystal structure of PhoU from *Pseudomonas aeruginosa*, a negative regulator of the Pho regulon. *Journal of Structural Biology*, *188*(1), 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2014.08.010>
- Leegwater, P. A.J., Boor, P. K. I., Yuan, B. Q., Van Der Steen, J., Visser, A., Könst, A. A. M., Oudejans, C. B. M., Schutgens, R. B. H., Pronk, J. C., & Van Der Knaap, M. S. (2002). Identification of novel mutations in MLC1 responsible for megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Human Genetics*, *110*(3), 279–283. <https://doi.org/10.1007/s00439-002-0682-x>
- Leegwater, Peter A.J., Yuan, B. Q., Van der Steen, J., Mulders, J., Könst, A. A. M., Boor, P. K. I., Mejaski-Bosnjak, V., Van der Maarel, S. M., Frants, R. R., Oudejans, C. B. M., Schutgens, R. B. H., Pronk, J. C., & Van der Knaap, M. S. (2001). Mutations of MLC1 (KIAA0027), encoding a putative membrane protein, cause megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *American Journal of Human Genetics*, *68*(4), 831–838. <https://doi.org/10.1086/319519>

- Ley, K. (2003). The role of selectins in inflammation and disease. *Trends in Molecular Medicine*, 9(6), 263–268. [https://doi.org/10.1016/S1471-4914\(03\)00071-6](https://doi.org/10.1016/S1471-4914(03)00071-6)
- Little, K. D., Hemler, M. E., & Stipp, C. S. (2004). *Dynamic Regulation of a GPCR-Tetraspanin-G Protein Complex on Intact Cells : Central Role of CD81 in Facilitating GPR56-G α / 11 Association*. 15(May), 2375–2387. <https://doi.org/10.1091/mbc.E03>
- Liu, H., Focia, P. J., & He, X. (2011). Homophilic adhesion mechanism of neurofascin, a member of the L1 family of neural cell adhesion molecules. *Journal of Biological Chemistry*, 286(1), 797–805. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.180281>
- López-Hernández, T., Ridder, M. C., Montolio, M., Capdevila-Nortes, X., Polder, E., Sirisi, S., Duarri, A., Schulte, U., Fakler, B., Nunes, V., Scheper, G. C., Martínez, A., Estévez, R., & Van Der Knaap, M. S. (2011). Mutant GlialCAM causes megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts, benign familial macrocephaly, and macrocephaly with retardation and autism. *American Journal of Human Genetics*, 88(4), 422–432. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.02.009>
- López-Hernández, T., Sirisi, S., Capdevila-Nortes, X., Montolio, M., Fernández-Dueñas, V., Scheper, G. C., van der Knaap, M. S., Casquero, P., Ciruela, F., Ferrer, I., Nunes, V., & Estévez, R. (2011). Molecular mechanisms of MLC1 and GLIALCAM mutations in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Human Molecular Genetics*, 20(16), 3266–3277. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr238>
- Mandell, K. J., & Parkos, C. A. (2005). The JAM family of proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(6), 857–867. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.01.005>
- Marceau, K., Ruttle, P. L., Shirtcliff, E. A., Essex, M. J., Susman, E. J., Studies, A., Hospital, R. I., Studies, F., & Orleans, N. (2015). Structural basis of kainate subtype glutamate receptor desensitization. *Nature*, 57(6), 742–768. <https://doi.org/10.1038/nature19352>.Structural
- Matar-Merheb, R., Rhimi, M., Leydier, A., Huché, F., Galián, C., Desuzinges-Mandon, E., Ficheux, D., Flot, D., Aghajari, N., Kahn, R., Di Pietro, A., Jault, J. M., Coleman, A. W., & Falson, P. (2011). Structuring detergents for extracting and stabilizing functional membrane proteins. *PLoS ONE*, 6(3), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018036>

- Matthäus, C., Langhorst, H., Schütz, L., Jüttner, R., & Rathjen, F. G. (2017). Cell-cell communication mediated by the CAR subgroup of immunoglobulin cell adhesion molecules in health and disease. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *81*, 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2016.11.009>
- Michelsen, K., Yuan, H., & Schwappach, B. (2005). Hide and run. *EMBO Reports*, *6*(8), 717–722. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400480>
- Moh, M. C., Zhang, C., Luo, C., Lee, L. H., & Shen, S. (2005). Structural and functional analyses of a novel Ig-like cell adhesion molecule, hepaCAM, in the human breast carcinoma MCF7 cells. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(29), 27366–27374. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500852200>
- Monje, M. (2018). Myelin plasticity and nervous system function. *Annual Review of Neuroscience*, *41*, 61–76. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-080317-061853>
- Montagna, G., Teijido, O., Eymard-Pierre, E., Muraki, K., Cohen, B., Loizzo, A., Grosso, P., Tedeschi, G., Palacín, M., Boespflug-Tanguy, O., Bertini, E., Santorelli, F. M., & Estévez, R. (2006). Vacuolating megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: functional studies of novel variants in MLC1. *Human Mutation*, *27*(3), 292. <https://doi.org/10.1002/humu.9407>
- Nagaraj, K., Kristiansen, L. V., Skrzynski, A., Castiella, C., Garcia-Alonso, L., & Hortsch, M. (2009). Pathogenic human L1-CAM mutations reduce the adhesion-dependent activation of EGFR. *Human Molecular Genetics*, *18*(20), 3822–3831. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp325>
- Narita, H., Yamamoto, Y., Suzuki, M., Miyazaki, N., Yoshida, A., Kawai, K., Iwasaki, K., Nakagawa, A., Takai, Y., & Sakisaka, T. (2011). Crystal structure of the cis-dimer of nectin-1: Implications for the architecture of cell-cell junctions. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(14), 12659–12669. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.197368>
- Ogita, H., Rikitake, Y., Miyoshi, J., & Takai, Y. (2010). Cell adhesion molecules nectins and associating proteins: Implications for physiology and pathology. *Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences*, *86*(6), 621–629. <https://doi.org/10.2183/pjab.86.621>

- Oosterheert, W., Xenak, K. T., Neviani, V., Pos, W., Doukeridou, S., Manshande, J., Pearce, N. M., Kroon-Batenburg, L. M. J., Lutz, M., Van Bergen En Henegouwen, P. M. P., & Gros, P. (2020). Implications for tetraspanin-enriched microdomain assembly based on structures of CD9 with EWI-F. *Life Science Alliance*, *3*(11), 1–16. <https://doi.org/10.26508/LSA.202000883>
- Park, E., Campbell, E. B., & MacKinnon, R. (2017). Structure of a CLC chloride ion channel by cryo-electron microscopy. *Nature*, *541*(7638), 500–505. <https://doi.org/10.1038/nature20812>
- Patzke, C., Max, K. E. A., Behlke, J., Schreiber, J., Schmidt, H., Dorner, A. A., Kröger, S., Henning, M., Otto, A., Heinemann, U., & Rathjen, F. G. (2010). The coxsackievirus - Adenovirus receptor reveals complex homophilic and heterophilic interactions on neural cells. *Journal of Neuroscience*, *30*(8), 2897–2910. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5725-09.2010>
- Piala, A. T., Moon, T. M., Akella, R., He, H., Cobb, M. H., & Goldsmith, E. J. (2014). Chloride sensing by WNK1 involves inhibition of autophosphorylation. *Science Signaling*, *7*(324), 1–10. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005050>
- Ponzoni, L., Zhang, S., Cheng, M. H., & Bahar, I. (2018). Shared dynamics of LeuT superfamily members and allosteric differentiation by structural irregularities and multimerization. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *373*(1749). <https://doi.org/10.1098/rstb.2017.0177>
- Prota, A. E., Campbell, J. A., Schelling, P., Forrest, J. C., Watson, M. J., Peters, T. R., Aurrand-lions, M., Imhof, B. A., Dermody, T. S., & Stehle, T. (2003). *Prota, Stehle, PNAS, 2003 - hJAM-A - Kristallstruktur und reovirus binding.*
- Raghavan, M., Fee, D., & Barkhaus, P. E. (2019). Generation and propagation of the action potential. In *Handbook of Clinical Neurology* (1st ed., Vol. 160). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64032-1.00001-1>
- 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*(4), 982–1008. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.10.028>
- Reatments, T., Sausville, E. A., Elsayed, Y., Monga, M., Kim, G., & Mesylate, I. (2003). *Signal Transduction – Directed Cancer.* 199–231.

- Robbins, E. M., Krupp, A. J., Perez de Arce, K., Ghosh, A. K., Fogel, A. I., Boucard, A., Südhof, T. C., Stein, V., & Biederer, T. (2010). SynCAM 1 Adhesion Dynamically Regulates Synapse Number and Impacts Plasticity and Learning. *Neuron*, *68*(5), 894–906. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.003>
- Sansom, M. S. P., Shrivastava, I. H., Bright, J. N., Tate, J., Capener, C. E., & Biggin, P. C. (2002). *Potassium channels: structures, models, simulations review*. *1565*, 294–307.
- Schutze, M. P., Peterson, P. A., & Jackson, M. R. (1994). An N-terminal double-arginine motif maintains type II membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO Journal*, *13*(7), 1696–1705. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06434.x>
- Seddon, A. M., Curnow, P., & Booth, P. J. (2004). Membrane proteins, lipids and detergents: Not just a soap opera. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1666*(1–2), 105–117. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.04.011>
- Senes, A., Ubarretxena-Belandia, I., & Engelman, D. M. (2001). The $\text{Ca} - \text{H}\cdots\text{O}$ hydrogen bond: A determinant of stability and specificity in transmembrane helix interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(16), 9056–9061. <https://doi.org/10.1073/pnas.161280798>
- Shapiro, L., Love, J., & Colman, D. R. (2007). Adhesion molecules in the nervous system: Structural insights into function and diversity. *Annual Review of Neuroscience*, *30*, 451–474. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.113034>
- Singhal, B. S., Gursahani, R. D., Udani, V. P., & Biniwale, A. A. (1996). Megalencephalic leukodystrophy in an Asian Indian ethnic group. *Pediatric Neurology*, *14*(4). [https://doi.org/10.1016/0887-8994\(96\)00048-3](https://doi.org/10.1016/0887-8994(96)00048-3)
- Sirisi, S., Figueira, M., López-Hernández, T., Minieri, L., Pérez-Rius, C., Gaitán-Peñas, H., Zang, J., Martínez, A., Capdevila-Nortes, X., De La Villa, P., Roy, U., Alia, A., Neuhaus, S., Ferroni, S., Nunes, V., Estévez, R., & Barrallo-Gimeno, A. (2014). Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts protein 1 regulates glial surface localization of GLIALCAM from fish to humans. *Human Molecular Genetics*, *23*(19), 5069–5086. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu231>

- Soroka, V., Kolkova, K., Kastrup, J. S., Diederichs, K., Breed, J., Kiselyov, V. V., Poulsen, F. M., Larsen, I. K., Welte, W., Berezin, V., Bock, E., & Kasper, C. (2003). Structure and interactions of NCAM Ig1-2-3 suggest a novel zipper mechanism for homophilic adhesion. *Structure*, *11*(10), 1291–1301.
<https://doi.org/10.1016/j.str.2003.09.006>
- Stipp, C. S., Kolesnikova, T. V., & Hemler, M. E. (2003). Functional domains in tetraspanin proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, *28*(2), 106–112.
[https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(02\)00014-2](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(02)00014-2)
- Straw, M. L., Hough, M. A., Wilson, M. T., & Worrall, J. A. R. (2019). A Histidine Residue and a Tetranuclear Cuprous-thiolate Cluster Dominate the Copper Loading Landscape of a Copper Storage Protein from *Streptomyces lividans*. *Chemistry - A European Journal*, *25*(45), 10678–10688.
<https://doi.org/10.1002/chem.201901411>
- Suades, A., Alcaraz, A., Cruz, E., Álvarez-Marimon, E., Whitelegge, J. P., Manyosa, J., Cladera, J., & Perálvarez-Marín, A. (2019). Structural biology workflow for the expression and characterization of functional human sodium glucose transporter type 1 in *Pichia pastoris*. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–11.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-37445-2>
- Südhof, T. C. (2008). Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease. *Nature*, *455*(7215), 903–911. <https://doi.org/10.1038/nature07456>
- Susa, K. J., Rawson, S., Kruse, A. C., & Blacklow, S. C. (2021). Cryo-EM structure of the B cell co-receptor CD19 bound to the tetraspanin CD81. *305*(January), 300–305.
- Takai, Y., & Nakanishi, H. (2003). Nectin and afadin: Novel organizers of intracellular junctions. *Journal of Cell Science*, *116*(1), 17–27.
<https://doi.org/10.1242/jcs.00167>
- Teijido, O., Casaroli-Marano, R., Kharkovets, T., Aguado, F., Zorzano, A., Palacín, M., Soriano, E., Martínez, A., & Estévez, R. (2007). Expression patterns of MLC1 protein in the central and peripheral nervous systems. *Neurobiology of Disease*, *26*(3), 532–545. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2007.01.016>

- Teijido, O., Martínez, A., Pusch, M., Zorzano, A., Soriano, E., del Río, J. A., Palacín, M., & Estévez, R. (2004). Localization and functional analyses of the MLC1 protein involved in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Human Molecular Genetics*, *13*(21), 2581–2594. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh291>
- Togashi, H., Sakisaka, T., & Takai, Y. (2009). Cell adhesion molecules in the central nervous system. *Cell Adhesion and Migration*, *3*(1), 29–35. <https://doi.org/10.4161/cam.3.1.6773>
- Tom, R., Bisson, L., & Durocher, Y. (2008). Culture of HEK293-EBNA1 cells for production of recombinant proteins. *Cold Spring Harbor Protocols*, *3*(3), 1–5. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4976>
- Topçu, M., Gartioux, C., Ribierre, F., Yalçinkaya, C., Tokus, E., Öztekin, N., Beckmann, J. S., Ozguc, M., & Seboun, E. (2000). Vacuolizing megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts, mapped to chromosome 22q(tel). *American Journal of Human Genetics*, *66*(2), 733–739. <https://doi.org/10.1086/302758>
- van der Knaap, M. S., Boor, I., & Estévez, R. (2012). Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: Chronic white matter oedema due to a defect in brain ion and water homeostasis. *The Lancet Neurology*, *11*(11), 973–985. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70192-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70192-8)
- van der Knaap, M. S., & Bugiani, M. (2017). Leukodystrophies: a proposed classification system based on pathological changes and pathogenetic mechanisms. In *Acta Neuropathologica* (Vol. 134, Issue 3). <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1739-1>
- Van Der Knaap, M. S., Lai, V., Köhler, W., Salih, M. A., Fonseca, M. J., Benke, T. A., Wilson, C., Jayakar, P., Aine, M. R., Dom, L., Lynch, B., Kálmánchey, R., Pietsch, P., Errami, A., & Scheper, G. C. (2010). Megalencephalic leukoencephalopathy with cysts without MLC1 defect two phenotypes. *Annals of Neurology*, *67*(6), 834–837. <https://doi.org/10.1002/ana.21980>
- Verdino, P., Witherden, D. A., Havran, W. L., & Wilson, I. A. (2010). The molecular interaction of CAR and JAML recruits the central cell signal transducer PI3K. *Science*, *329*(5996), 1210–1214. <https://doi.org/10.1126/science.1187996>

- Verkman, A. S., & Galiotta, L. J. V. (2009). Chloride channels as drug targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8(2), 153–171. <https://doi.org/10.1038/nrd2780>
- Wang, J., Shang, J., Wu, Y., Gu, Q., Xiong, H., Ding, C., Wang, L., Gao, Z., Wu, X., & Jiang, Y. (2011). Identification of novel MLC1 mutations in Chinese patients with megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (MLC). *Journal of Human Genetics*, 56(2), 138–142. <https://doi.org/10.1038/jhg.2010.146>
- Washbourne, P., Dityatev, A., Scheiffele, P., Biederer, T., Weiner, J. A., Christopherson, K. S., & El-Husseini, A. (2004). Cell adhesion molecules in synapse formation. *Journal of Neuroscience*, 24(42), 9244–9249. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3339-04.2004>
- Wei J, K. G. (2018). Single particle cryo-EM – how did it get here and where will it go Yifan. *Physiology & Behavior*, 176(1), 139–148. <https://doi.org/10.1126/science.aat4346>.Single
- Wong, E. V., & Open Textbook Library. (2009). *Cells : molecules and mechanisms*. 1–276.
- Wu, J., Yan, Z., Li, Z., Qian, X., Lu, S., Dong, M., Zhou, Q., & Yan, N. (2016). Structure of the voltage-gated calcium channel Cav1.1 at 3.6 Å resolution. *Nature*, 537(7619), 191–196. <https://doi.org/10.1038/nature19321>
- Wu, M., Moh, M. C., & Schwarz, H. (2016). HepaCAM associates with connexin 43 and enhances its localization in cellular junctions. *Scientific Reports*, 6(November), 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep36218>
- Xun, C., Luo, C., Wu, X., Zhang, Q., Yan, L., & Shen, S. (2010). Expression of hepaCAM and Its Effect on Proliferation of Tumor Cells in Renal Cell Carcinoma. *Urology*, 75(4), 828–834. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2009.11.024>
- Zhang, X., Dong, C., Wu, Q. J., Balch, W. E., & Wu, G. (2011). Di-acidic motifs in the membrane-distal C termini modulate the transport of angiotensin II receptors from the endoplasmic reticulum to the cell surface. *Journal of Biological Chemistry*, 286(23), 20525–20535. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.222034>
- Zimmerman, B., Kelly, B., McMillan, B. J., Seegar, T. C. M., Dror, R. O., Kruse, A. C., & Blacklow, S. C. (2016). Crystal Structure of a Full-Length Human Tetraspanin Reveals a Cholesterol-Binding Pocket. *Cell*, 167(4), 1041-1051.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.056>

Zinn, K., & Özkan, E. (2017). Neural immunoglobulin superfamily interaction networks.

Current Opinion in Neurobiology, 45, 99–105.

<https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.05.010>

ANNEX: ARTICLES

PUBLICATS

ARTICLES PUBLICATS.

Elorza-Vidal, X., **Xicoy-Espauella, E.**, Pla-Casillanis, A., Alonso-Gardón, M., Gaitán-Peñas, H., Engel-Pizcueta, C., Fernández-Recio, J., & Estévez, R. (2020). Structural basis for the dominant or recessive character of GLIALCAM mutations found in leukodystrophies. *Human Molecular Genetics*, 29(7), 1107–1120. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddaa009>

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., Tejido, O., Barrallo-Gimeno, A., Palacín, M., & Nunes, V. (2018). Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: A personal biochemical retrospective. *European Journal of Medical Genetics*, 61(1), 50–60. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2017.10.013>

GENERAL ARTICLE

Structural basis for the dominant or recessive character of *GLIALCAM* mutations found in leukodystrophies

Xabier Elorza-Vidal^{1,2}, Efren Xicoy-Espauella¹, Adrià Pla-Casillanis¹, Marta Alonso-Gardón¹, Héctor Gaitán-Peñas^{1,2}, Carolyn Engel-Pizcueta¹, Juan Fernández-Recio^{3,4,5} and Raúl Estévez^{1,2,*}

¹Unitat de Fisiologia, Departament de Ciències Fisiològiques, Genes Disease and Therapy Program IDIBELL-Institute of Neurosciences, Universitat de Barcelona, L'Hospitalet de Llobregat, Spain, ²Centro de Investigación en red de enfermedades raras (CIBERER), ISCIII, Madrid, Spain, ³Barcelona Supercomputing Center (BSC), Barcelona, Spain, ⁴Institut de Biologia Molecular de Barcelona, CSIC, Barcelona, Spain and ⁵Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV), CSIC- Universidad de La Rioja- Gobierno de la Rioja, Logroño, Spain

*To whom correspondence should be addressed at: Raúl Estévez, Facultat de Medicina, Departament de Ciències Fisiològiques, Universitat de Barcelona-IDIBELL, C/Feixa Llarga s/n 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain. Tel: (+34) 93 403 9781; Fax: (+34) 93 402 4268; Email: restevez@ub.edu

Abstract

Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (MLC) is a type of leukodystrophy characterized by white matter edema, and it is caused mainly by recessive mutations in *MLC1* and *GLIALCAM* genes. These variants are called *MLC1* and *MLC2A* with both types of patients sharing the same clinical phenotype. In addition, dominant mutations in *GLIALCAM* have also been identified in a subtype of MLC patients with a remitting phenotype. This variant has been named *MLC2B*. *GLIALCAM* encodes for an adhesion protein containing two immunoglobulin (Ig) domains and it is needed for *MLC1* targeting to astrocyte–astrocyte junctions. Most mutations identified in *GLIALCAM* abolish *GlialCAM* targeting to junctions. However, it is unclear why some mutations behave as recessive or dominant. Here, we used a combination of biochemistry methods with a new developed anti-*GlialCAM* nanobody, double-mutants and cysteine cross-links experiments, together with computer docking, to create a structural model of *GlialCAM* homo-interactions. Using this model, we suggest that dominant mutations affect different *GlialCAM*–*GlialCAM* interacting surfaces in the first Ig domain, which can occur between *GlialCAM* molecules present in the same cell (*cis*) or present in neighbouring cells (*trans*). Our results provide a framework that can be used to understand the molecular basis of pathogenesis of all identified *GLIALCAM* mutations.

Introduction

Leukodystrophies constitute a large group of genetic disorders primarily affecting CNS white matter (1). Within these, Mega-

lencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (MLC) is characterized by early-onset macrocephaly, epilepsy and cerebral white matter edema (2). It can be caused by mutations in two

Received: December 12, 2019. Revised: January 10, 2020. Accepted: January 15, 2020

© The Author(s) 2020. Published by Oxford University Press.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com

different genes: *MLC1*, which is more frequent (3), and *GLIALCAM* (4). Detailed characterization of MLC patients with *GLIALCAM* mutations revealed two different phenotypes: *MLC2A*, caused by two recessive mutations and which is indistinguishable from patients containing mutations in *MLC1*, and *MLC2B*, caused by one dominant mutation and which shows a remitting, more benign MLC phenotype (2,5).

MLC1 is a membrane protein of unknown functions (6), while *GlialCAM* is an adhesion molecule that belongs to the immunoglobulin superfamily (7). *GlialCAM* works as an obligatory subunit of *MLC1*, being required for *MLC1* endoplasmic reticulum exit and targeting to astrocyte–astrocyte junctions (8–10). In addition, *GlialCAM* is further characterized as an auxiliary subunit of the *ClC-2* chloride channel (11), targeting it to cell–cell junctions and modifying its functional properties (12).

Mutagenesis studies determined that the extracellular domain of *GlialCAM* is required for cell junction targeting, as well as for mediating interactions with itself or with *MLC1* and *ClC-2* (13). Accordingly, all MLC missense mutations in *GLIALCAM* have been identified in the extracellular domain (2). Within this domain, most missense mutations are located in the first Ig domain (IgV type) and affect *GlialCAM* localization at cell–cell junctions, observing the same phenotype for mutations identified in *MLC2A* or *MLC2B* patients (4,14,15). In contrast, the remaining mutations, which are located in the second Ig domain (IgC2 type), do not affect *GlialCAM* localization (14).

In order to understand what was the biochemical basis of the genetic character of these mutations, co-expression experiments in primary astrocytes were performed (4). These experiments revealed that the co-expression of *GlialCAM* wild-type (WT) with *GlialCAM* containing an *MLC2B* mutation affected the targeting of *GlialCAM* WT. In contrast, no effect was observed in *GlialCAM* WT upon co-expression with *GlialCAM* containing *MLC2A* mutations. These effects have been recently validated *in vivo* after the characterization of a knock-in *Glialcam* mice containing the mutation G89S identified in *MLC2B* patients (9). This mutation affected the targeting of the protein to cell–cell junctions in Bergmann glia, showed vacuoles in the cerebellum in homozygous mice and the heterozygous mice for this mutation showed also a partially altered *GlialCAM* localization.

All *GLIALCAM* missense mutations studied to date in the first IgV domain reduce the ability of the mutant to interact with *GlialCAM* WT in the same cell. However, the mutation p.D128N, identified in *MLC2B* patients, showed an equal ability to interact with *GlialCAM* WT (14). Thus, a reduced interaction with *GlialCAM* WT does not sufficiently explain why some mutations behave in a dominant or in a recessive manner. Furthermore, none of the *GLIALCAM* *MLC2A* or *MLC2B* mutations identified to date show a decrease in the interaction of *GlialCAM* with *MLC1* or *ClC-2*, and all *GlialCAM* mutants are still able to change the functional properties of *ClC-2*, although its targeting to cell junctions is abolished (14).

So far, there is no evidence to suggest molecular clues that could be used to predict the genetic behaviour of *GlialCAM* mutants. One puzzling example is that some amino acids have been found containing recessive (the mutation p.R92Q was identified in *MLC2A* patients) or dominant mutations (the mutation p.R92W was identified in *MLC2B* patients) (4). Therefore, the molecular basis explaining why a mutation in *GLIALCAM* is recessive or dominant is completely unknown.

In this work, we aimed to understand the biochemical basis that determines why some *GLIALCAM* mutations behave as recessive or as dominant. Using a combination of computational

and biochemical approaches, we provide a model for *GlialCAM* homo-interactions that explains the genetic behaviour of *GLIALCAM* mutations.

Results

Biochemical characterization of newly identified *MLC2B* *GLIALCAM* mutations

Previous studies (14) characterized most missense *GLIALCAM* mutations identified in *MLC2A* and *MLC2B* patients located in the first IgV domain. These studies indicated that nearly all IgV mutations caused a reduction of the targeting of *GlialCAM* to cell–cell junctions as well as a reduced ability to interact with *GlialCAM* WT (as measured by split-TEV assays). An exception was the mutation p.D128N that, despite having a targeting defect, maintained its ability to interact with WT *GlialCAM* (14).

We characterized in more detail two newly identified *MLC2B* *GLIALCAM* mutations, p.S59N (2) and p.Q56P (16). Both mutations showed a targeting defect to cell–cell junctions (Fig. 1A and B). Then, we analyzed their ability to interact with *GlialCAM* WT using split-TEV assays. The experiments showed that mutants p.Q56P and p.S59N maintained the ability to interact with *GlialCAM* WT, as the mutant p.D128N (14) (Fig. 1C).

Taking these new results into account, we classified mutations affecting residues into the first IgV domain of *GlialCAM* into three different groups (Fig. 1D): 1) mutants found in *MLC2A* patients (in green: p.R98C, p.R92Q) that show a reduced ability to interact with *GlialCAM* WT; 2) a subset of mutants (Dominant 1, D1) found in *MLC2B* patients (in red: p.G89S/D, p.R92W) with a reduced ability to interact with *GlialCAM* WT; and 3) a subset of mutants (Dominant 2, D2) found in *MLC2B* patients (in blue: p.Q56P, p.S59N, p.D128N) which display a normal ability to interact with *GlialCAM* WT. In a homology model of *GlialCAM* monomer (see Materials and Methods) (Fig. 1E), D2 mutants were in predicted loops within the same region of the IgV domain, very close in space, despite some of them being far in sequence.

In vitro biochemical assays of the dominant behaviour of *MLC2B* mutants

To systematically analyze the dominant behaviour of *MLC2B* mutations, we developed a simple test to determine whether a mutation was acting as dominant in terms of altered trafficking of the WT protein. To achieve this, we transfected HeLa cells with pCDNA3 *GlialCAM* (WT or containing an *MLC2* mutation)-E2A-flag-tagged WT *GlialCAM*, which allowed the stoichiometric expression of untagged WT/mutant *GlialCAM* and flag-tagged WT (Fig. 1F, inset). We also co-transfected with *MLC1* in order to maximize the cells containing *GlialCAM* at cell–cell junctions, as previously described (15). We then evaluated the percentage of cells where the flag tagged *GlialCAM* protein was located at cell–cell junctions by immunofluorescence experiments. These experiments indicated that *GlialCAM* containing an *MLC2A* mutation (p.R92Q) did not influence the localization at cell–cell junctions of the flag-tagged WT *GlialCAM*, whereas *GlialCAM* containing two different types of *MLC2B* mutations (p.R92W and p.D128N) reduced the localization of flag-tagged *GlialCAM* at cell–cell junctions (Fig. 1F). Thus, this newly developed assay was suitable to elucidate whether a *GlialCAM* mutant was affecting in a dominant manner, the junctional trafficking of the WT protein.

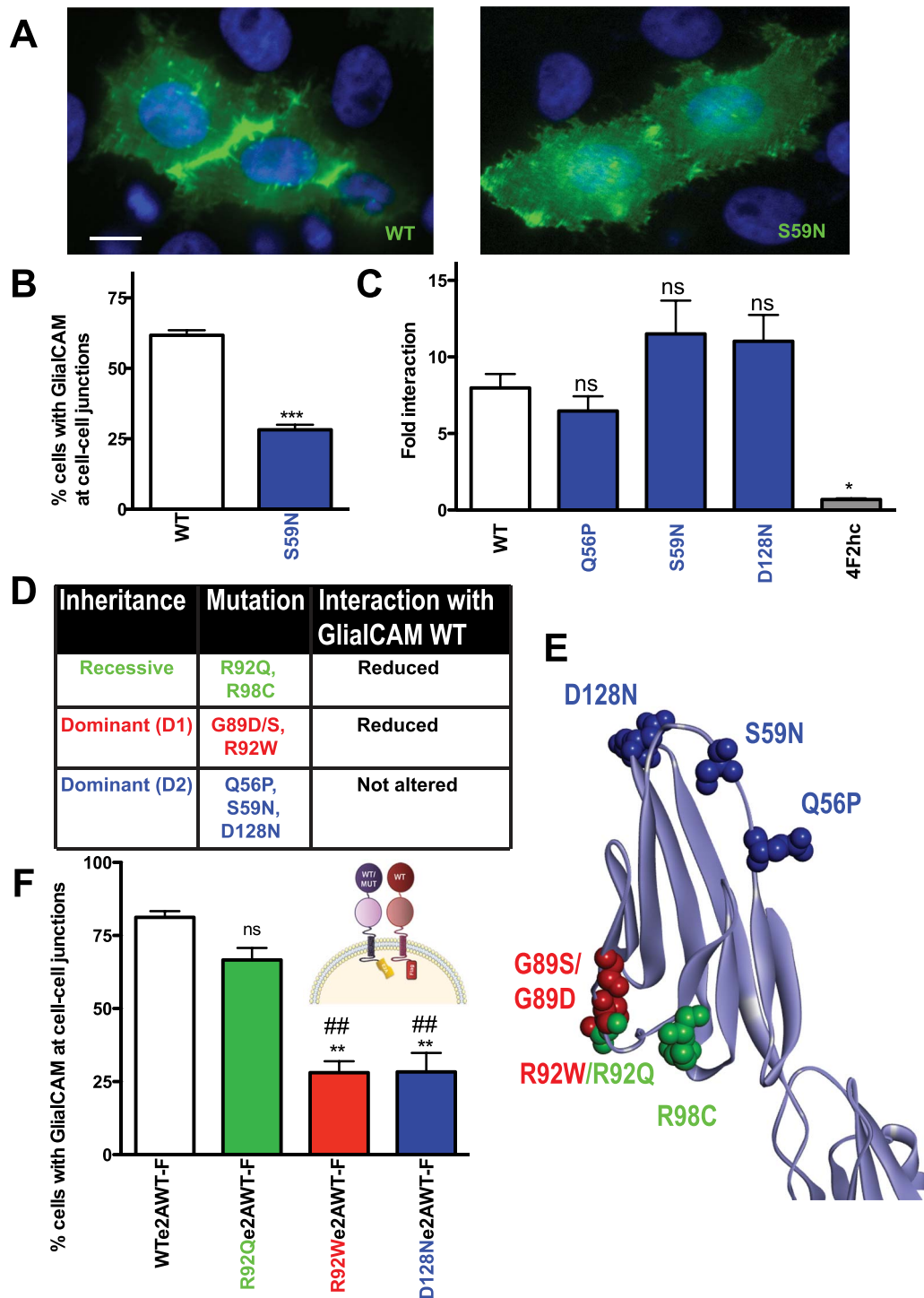


Figure 1. Dominant and recessive MLC2 mutations in *GLIALCAM*. (A) Subcellular localization of flag-tagged WT or S59N GlialCAM at cell–cell junctions. Scale bar: 20 μ m. (B) Quantification of WT and S59N GlialCAM at cell–cell junctions. *** $P < 0.001$ when compared with the WT in paired t-student test. Graphics represent mean \pm SEM. (C) Split-TEV assays of GlialCAM WT interaction with different GlialCAM dominant mutants Q56P, S59N and D128N. Protein 4F2 is used as a negative control of protein interaction. Graphics represent mean \pm SEM. ns = non significant, * $P < 0.05$ when compared with GlialCAM WT-WT interaction in Bonferroni multiple comparison's test of five different experiments. (D) Classification of GlialCAM IgV mutants according to inheritance (dominant or recessive) and the results of a biochemical assay that measures the level of interaction of the mutants with GlialCAM WT. Mutants are coloured according to this classification. Recessive mutants are coloured in green, dominant mutants (D1) that show a reduced oligomerization in red, and dominant mutants (D2) with a normal oligomerization in blue. (E) Three-dimensional homology model of the IgV domain of GlialCAM, with the position of the mutations highlighted. (F) Quantification of the percentage of GlialCAM WT cell–cell junction targeting when co-expressed with the GlialCAM WT (130 pair of cells counted) recessive mutant p.R92Q (115 pair of cells) dominant p.R92W (128 pair of cells) or dominant p.D128N (119 pair of cells). Graphics represent mean \pm SEM. ns = non-significant, ** $P < 0.01$ when compared with co-expression with the WT, ## $P < 0.01$ when comparing dominant mutants with recessive mutant p.R92Q with Bonferroni multiple comparison's test of four different experiments. The inset is a schematic representation of the dominance assay performed, where different GlialCAM proteins (WT or mutant) are co-expressed with flag (F)-tagged GlialCAM WT is achieved by the fusion of both proteins through an E2A peptide.

Characterization of a newly developed nanobody that blocks GlialCAM targeting at cell junctions

As indicated in previous studies (9,13), GlialCAM may form homophilic interactions *in cis* (within the same cell) and homophilic interactions *in trans* (with the neighbouring cell) in order to localize at cell–cell junctions. With the aim of getting information about the regions of the GlialCAM molecule that may be important in mediating *trans* interactions, we developed nanobodies recognizing the extracellular side of GlialCAM. Interestingly, the application of one of the developed nanobodies (Nb 139G1) to cells expressing GlialCAM-VFP blocked the localization of GlialCAM at cell–cell junctions in a concentration-dependent manner (Fig. 2A). In contrast, the application of a control nanobody detecting an unrelated protein at the maximal concentration used did not inhibit GlialCAM localization at cell–cell junctions.

To find which regions of the extracellular domain of GlialCAM were recognized by the nanobody, we expressed GlialCAM with deletions in the IgC2 or in the IgV domain and used flow-cytometry to detect the expressed protein. To normalize for expressed protein at the plasma membrane, we used a monoclonal antibody that detects extracellular GlialCAM. Previous immunofluorescence experiments indicated that both mutant forms (lacking either IgV or IgC2 domain) are expressed at the plasma membrane (13). Deleting the IgC2 reduced partially the binding of the monoclonal and the nanobody (Fig. 2B). In clear contrast, deletion of the IgV domain abolished completely the binding of both antibodies, suggesting that both antibodies mainly bind to the IgV domain (Fig. 2B).

We then tested whether MLC2 GlialCAM mutants affect the binding of the nanobody using flow cytometry. We monitored the binding of the monoclonal antibody as a control of surface expression, which was similar for all our mutants of interest (Fig. 2C for p.Q56P). Interestingly, we observed differences in the binding of the nanobody between the different mutations. We represented the mutants and the effect on nanobody binding in the model of GlialCAM monomer (Fig. 2E). Some mutants, such as p.G89D and p.R98C, decreased binding (Fig. 2D and E). On the other hand, other mutants such as p.R92Q and p.R92W increased binding (Fig. 2D and E). Importantly, mutant p.Q56P was the only that showed completely abolished binding of the nanobody (Fig. 2C–E).

Investigating D2 MLC2B mutants reveal a mechanism of dominance

From our previous results using a nanobody that blocked GlialCAM junctional targeting possibly by inhibiting *trans* interactions, we hypothesized that the region close to residue Q56 may be involved in the formation of these *trans* interactions. Accordingly, we reasoned that mutations p.Q56P, p.S59N and p.D128N, which are all very close in space and are all D2 dominant mutants, may affect specifically *trans* interactions. The replacement of a glutamine by a proline may introduce a kink in the beta-strand. Nonetheless, how mutations p.S59N and p.D128N may affect the structure was unclear.

In western blot experiments, we realized that mutants p.S59N and p.D128N showed a higher motility in SDS gels than the WT protein (Fig. 3A). Analyzing the amino acid protein sequence around the mutation, we noticed that in both cases, the mutations putatively introduced new *N*-glycosylation sites (Fig. 3B). To prove that this was the case, we compared the motility of GlialCAM WT and these mutants after treatment with Endo

Glycosidase-F (Endo-F), which removes all *N*-glycosylation sites (Fig. 3C). The motility of the mutants in SDS after treatment with Endo-F was equal to the motility of the WT protein, indicating that the mutants in fact introduced a new *N*-glycosylation site. Thus, we speculate that the new glycosylations created by these mutations might affect specifically *trans* interactions within GlialCAM proteins.

After careful analysis of homologous structures, we identified a possible template for *trans* interactions, between the domains 2 and 3 of contactin (PDB 3JXA) (17). This protein has the highest sequence identity with the GlialCAM extracellular domain (30% SI) (Fig. 3D). Therefore, we built a *trans* dimer by superimposing two copies of the GlialCAM monomer model on contactin domains 2 and 3. In this model, the three mutations studied here mapped to the same interface (Fig. 3E). We therefore conclude that D2 mutations are dominant because they specifically disrupt *trans* interactions between opposed molecules, without interfering with GlialCAM homooligomerization in the same cell.

Experiments toward the development of a structural model of GlialCAM dimers

We further aimed to clarify the molecular basis for the dominance of D1 mutants. As happens in other diseases caused by mutations with both recessive and dominant behaviours (18), we reasoned that the dominant mutations might affect specifically protein contact interfaces of the GlialCAM molecule. As previous studies reported a *cis* dimer orientation that was quite conserved in other members of the CAM family (e.g. nectin-1-EC, CAR) (19), we explored whether GlialCAM could adopt the same *cis* dimeric orientation by superimposing two copies of the monomer model on the corresponding subunits of the CAR dimer.

We first aimed to demonstrate using experimental evidence that the resulting template-based *cis* model may be correct. The model suggested the existence of intermolecular interactions between the pair of residues D129-R92 and R64-E86 (Fig. 4A). We performed directed mutagenesis of these residues to change them to cysteines and expressed in HeLa cells alone or together with the predicted corresponding pair, and the presence of GlialCAM dimers was evaluated by western blot in non-reducing conditions.

Unexpectedly (Fig. 4B), the mutants E86C and R92C formed dimers when expressed alone, independently of the co-expression with the predicted pair. Thus, the cysteine cross-linking experiments invalidated this first structural model based on homology modelling.

As the cross-linking experiments suggested that the glutamate 86 (E86) of one GlialCAM monomer was predicted to be close to the glutamate 86 of the other monomer, we reasoned that other closer residues containing a positive charge might form a positive–negative pair. A closer inspection of the template-based model showed lysine 68 (K68) of one monomer in the vicinity of glutamate 86 (E86) of the other monomer (Fig. 4C), which could be even closer after a small re-arrangement of the dimeric interface. In agreement with the hypothesis that E86 is being stabilized by K68, mutating E86 to arginine (p.E86R) abolished GlialCAM protein expression (Fig. 4D), and its expression was recovered by mutating additionally K68 to glutamate (p.K68E) (Fig. 4D). In contrast, expression was not abolished in the protein containing only the mutation K68E (Fig. 4D) and both mutants (i.e. p.K68E and p.K68E-E86R) showed a defective targeting to cell–cell junctions (Supplementary Material, Fig. S1),

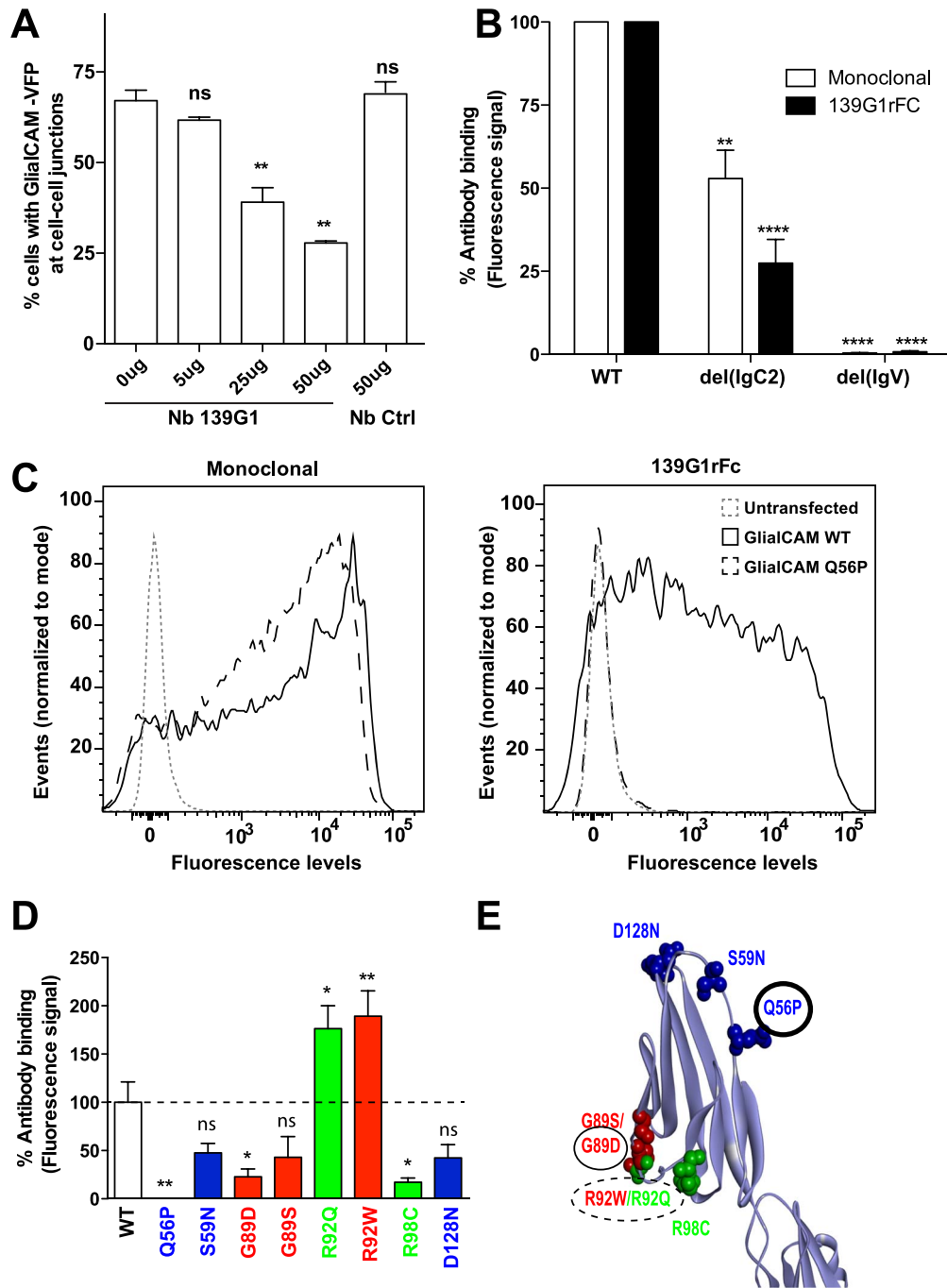


Figure 2. Characterization of a nanobody that blocks GlialCAM localization at cell-cell junctions. (A) HeLa cells were transfected with VFP-tagged GlialCAM WT construct and treated with different doses of 139G1 Nb (5, 25 and 50 µg); 181 Nb was used as a negative control. Quantification of the percentage of cells with GlialCAM at cell-cell junctions without Nb was $67.1 \pm 2.86\%$ (110 cells), with 5 µg of Nb was $61.7 \pm 0.84\%$ (122 cells), 25 µg of Nb was $39.2 \pm 4.4\%$ (117 cells), 50 µg of Nb was $27.8 \pm 0.5\%$ (111 cells) and 50 µg of Nb control was $68.1 \pm 3.4\%$ (104 cells). Graphics represent mean \pm SEM. ** $P < 0.01$ in ANOVA Bonferroni multiple comparison test against WT. Data from two independent transfections. (B) Quantification of the percentage of antibody binding in HEK293T cells transfected with GlialCAM WT, IgC2 deletion of GlialCAM and IgV deletion of GlialCAM using a flow cytometry assay. Deletions of IgV and IgC2 were performed by PCR resulting in the amino acid sequence ‘..TSPVPISRQV.’ for del(IgV) and ‘..TTVLQGRSLPV.’ for del(IgC2). Percentage of antibody binding against del(IgC2) and del(IgV) was normalized with the antibody binding against WT. The mean percentage of monoclonal antibody (white) against del(IgC2) was $52.8 \pm 8.6\%$ ($n=4$) and against del(IgV) was $0.42 \pm 0.07\%$ ($n=4$). The mean percentage of 139G1 Mb (black) against del(IgC2) was $27.46 \pm 7.1\%$ ($n=4$) and against del(IgV) was $0.74 \pm 0.3\%$ ($n=4$). Graphics represent mean \pm SEM. ** $P < 0.01$ **** $P < 0.0001$ in ANOVA Bonferroni multiple comparison test. (C) Representative flow cytometry experiments showing the binding of the monoclonal antibody (left) and the 139G1 monobody (right) in untransfected HEK293T cells and cells transfected with WT and p.Q56P GlialCAM. (D) Quantification of 139G1 Mb binding by flow cytometry assay in HEK293T cells transfected with different GlialCAM IgV mutants. All the signal of the nanobody for the different GlialCAM IgV mutants were divided by the signal of the monoclonal antibody and normalized with the 139G1 Mb binding against GlialCAM WT. The mean percentage of antibody binding for each mutant was the following: p.Q56P was $0.7 \pm 0.4\%$ ($n=5$); p.S59N was $47.5 \pm 9.9\%$ ($n=5$); p.G89D was $22.9 \pm 8.1\%$ ($n=4$); p.G89S was $43.1 \pm 21.4\%$ ($n=4$); p.R92Q was $176.3 \pm 23.9\%$ ($n=4$); p.R92W was $189.3 \pm 26.3\%$ ($n=4$); p.R98C was $17.1 \pm 4.5\%$ ($n=3$) and p.D128N was $42.3 \pm 13.8\%$ ($n=5$). Graphics represent mean \pm SEM. ns = non-significant; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ in ANOVA Bonferroni multiple comparison test.

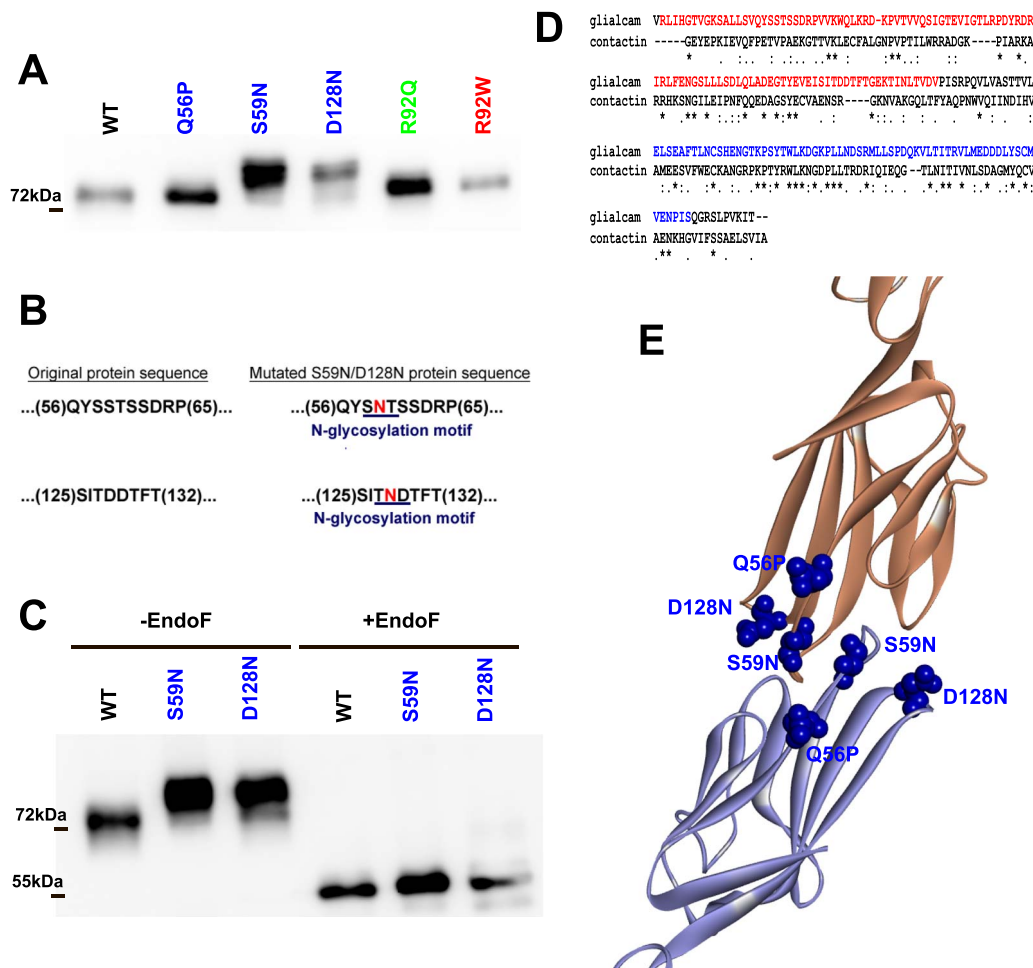


Figure 3. Dominant mutants p.S59N and p.D128N introduce new glycosylation sites in GlialCAM. (A) Western blot of transfected cells with flag-tagged GlialCAM WT or carrying dominant or recessive mutations was performed with an antibody detecting the flag epitope. Dominant mutants p.S59N and p.D128N present an increased molecular weight. Another independent experiment gave the same results. (B) Predicted N-glycosylation motifs that appear in the GlialCAM amino acid sequence due to the p.D128N or the p.S59N dominant mutations. (C) Western-blot assay of transfected cells with WT, p.S59N or p.D128N GlialCAM plasmids in control conditions (left) or treated with Endoglycosidase-F (Endo-F) (right) that removes all asparagine-linked mannoses. Treatment with Endo-F results in all GlialCAM constructs presenting the same molecular weight around 50 kDa. Two additional experiments gave the same results. (D) Alignment between the Ig domains of contactin and GlialCAM. The IgV domain of GlialCAM is coloured in red and the IgC2 domain in blue. (E) Homology model generated to explain the *trans* interaction between the IgV domain of two GlialCAM molecules with key dominant mutants p.Q56P, p.S59N and p.D128N highlighted in blue.

suggesting that E86 may form additional interactions with other residues.

Development of a new structural model of GlialCAM dimerization

Since mutational data and cross-linking experiments did not support the template-based dimer model, we decided to model the *cis* dimer by docking, using the monomer model as input (see [Materials and Methods](#)). We selected only docking orientations in which E86 residues from both molecules were within 8 Å distance. From the resulting docking models, the one with the closest E86-K68 distance (6.3 Å) was consistent with all the above mutational data and cross-linking experiments. The new model suggested a large interface formed by the surfaces of the same opposing beta-strands of the IgV domains of two GlialCAM molecules (Fig. 5A, dotted-rectangle in yellow). The interacting segment was formed by residues ranging from Glutamate 86 (E86, in the top) to Arginine 92 (R92, in the bottom) of each GlialCAM molecule (Fig. 5A). To test if this segment (beta strand)

from each GlialCAM monomer was interacting in the dimer, we generated new cysteine mutants from the residues of this strand (Isoleucine 88 (I88), Threonine 90 (T90), Leucine 91 (L91)). As a control, we generated the cysteine mutant of Glutamine 81 (Q81), which is also very close, but it is not predicted to be interacting. After expressing these mutants in HeLa cells, we analyzed the formation of GlialCAM dimers by western blot (Fig. 5B). We observed the dimer formation between the pairs of residues E86, I88, T90, L91 and R92, but not with Q81. Treating the extracts with reducing agents (DTT) disrupted the dimers, further confirming that dimers of the cysteine mutants were formed by disulphide bonds (Fig. 5B). In summary, these experiments indicated that the residues from positions 86 to 92 form a specific GlialCAM–GlialCAM interacting segment.

As an additional test that this segment was interacting, we reasoned that introducing a glycosylation site in that segment might work as a dominant mutation. Mutation I88N (Fig. 5C), which increased the motility of GlialCAM because it introduces a new glycosylation (Fig. 5C, inset), caused a dramatic reduction of GlialCAM WT targeting to cell junctions (Fig. 5D). As a control,

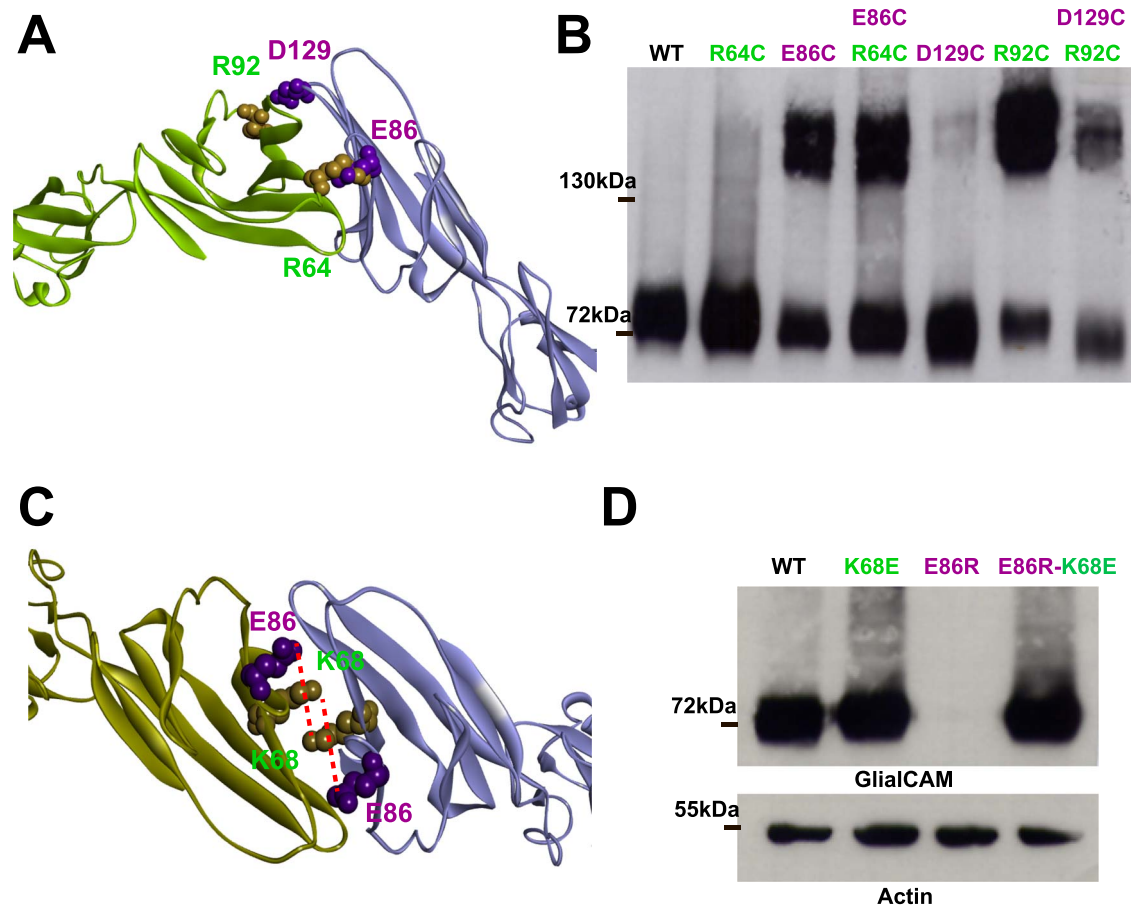


Figure 4. Development and biochemical testing of a structural domain of GlialCAM cis-homooligomerization. (A) Three-dimensional model of GlialCAM generated by homology modelling using another IgCAM molecule as a template. Possible pairs of interacting residues R64-E86 and R92-D129 are highlighted in orange/purple colours. (B) Western blot of GlialCAM WT or mutants changed to Cysteine R64C, E86C, D129C and R92C expressed alone or co-transfected in pairs (R64C + E86C and D129C + R92C) performed to observe Cysteine cross-linked dimerization between the two-paired mutants. Mutants E86C and R92C alone show dimerization, as observed at the 140 kDa band. Representative western blot from three independent experiments. (C) Structural representation of the negatively charged residue E86 in the IgV dimer interface. Structural analysis revealed the positively charged residue K68 in the vicinity of E86, which could be even closer after a small interface rearrangement. (D) Western blot of transiently transfected cells with GlialCAM WT, K68E mutant, E86R mutant or GlialCAM carrying both aminoacid changes K68E and E86R. While E86R is not expressed, double mutant E86R + K68R protein levels are recovered and similar to protein levels of GlialCAM WT. Data shown are from a representative experiment, out of three independent ones. Actin was used as a loading control.

mutation P76N (Fig. 5C), which also introduces a glycosylation site, reduced only slightly the targeting of GlialCAM WT to cell junctions (Fig. 5D).

Additional characterization of cysteine mutants in the interacting segment provide new keys to differentiate dominant and recessive mutants

We additionally assessed if these cysteine mutants from the GlialCAM interacting segment showed a defect in the targeting to cell-cell junctions (Fig. 6A). Unexpectedly, compared with GlialCAM WT expressed alone, mutant E86C showed an increased targeting to cell-cell junctions, reaching the same values of the co-expression of GlialCAM plus MLC1 (Fig. 6A) (15). In contrast, all the other cysteine mutants (I88C, T90C, R91C and R92C) showed a defect in the targeting to cell-cell junctions.

Given these results, we reasoned that mutation E86C might stabilize the GlialCAM dimer in a more stable conformation, which will result in an increased targeting of the mutant to cell-cell junctions. Then, we decided to explore whether the introduction of the mutation E86C might reverse the trafficking defect

caused by recessive or dominant mutations. It was found (Fig. 6B) that the E86C mutation rescued almost completely the trafficking defect caused by the recessive mutation p.R92Q, while it did not increase the targeting of dominant mutants (D1 (p.R92W) and D2 (p.S59N)) to cell junctions (Fig. 6B).

Analyzing the structural mechanism of dominance of some MLC2B mutations

From all GLIALCAM mutations identified in MLC2B patients, those affecting their interaction with GlialCAM (i.e. p.G89S/D, p.R92W) are found in the identified cis-dimerization interacting segment. In contrast, all the MLC2A mutations except p.R92Q are found outside of this segment (p.K68M, p.R98C, p.T132N), suggesting that mutations located in this specific segment will be dominant. To understand the behaviour of the residue R92, we constructed several mutants of this residue to different amino acids, co-expressed them with GlialCAM WT (Fig. 7A) and analyzed whether they behave in a dominant or recessive manner regarding the targeting of GlialCAM WT. Mutation of R92 to the small amino acid alanine (A) did not result in a significant dom-

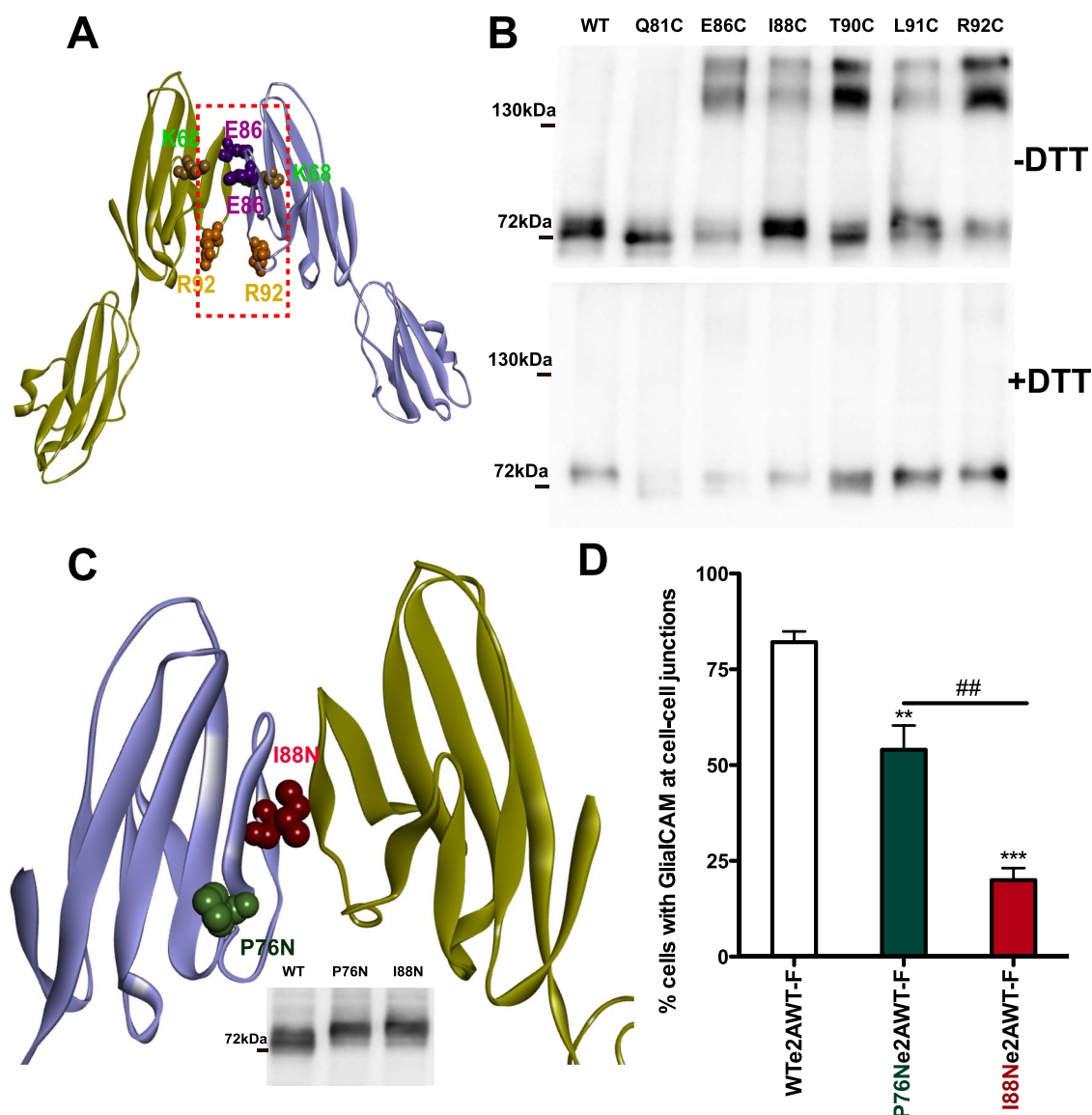


Figure 5. Three-dimensional model of GlialCAM homo-dimerization based on docking. (A) Structural representation of the new structural model of GlialCAM dimer based on docking analysis after applying several constraints based on the results from biochemical studies. The interacting surface between the two IgV domains is highlighted in yellow (left). Residues E86 and R92 are paired in close proximity and residue K68 is also highlighted. (B) Western-blot assay of cysteine cross-link in the absence or in the presence of 100 mM DTT between the following residues mutated to cysteine: Q81C, E86C, I88C, T90C, L91C and R92C. GlialCAM WT is used as a negative control. Dimers are observed on the mutants E86C, I88C, T90C, L91C and R92C at 140 kDa. Representative western-blot of three independent experiments. (C) Scheme of the IgV interaction showing the position of the introduction of two different glycosylation sites, I88N in the interacting segment and P76N as a control. The inset shows a western blot of transfected cells with flag-tagged GlialCAM WT or carrying the introduced glycosylation sites detected with an antibody detecting the flag epitope. Both P76N and I88N present an increased molecular weight. Another experiment gave the same results. (D) Biochemical dominance assay of GlialCAM WT targeting to cell-cell junctions co-expressed with different glycosylation mutants. Quantification of flag-tagged GlialCAM at cell-cell junctions (right) when co-expressed in E2A constructs with GlialCAM WT (232 cells), mutant P76N (174 cells) and mutant I88N (176 cells). Graphics represent mean \pm SEM. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ when compared with co-expression with the WT. In addition, we also compared with the mutant P76N, to distinguish better between recessive and dominant effects. ## $P < 0.01$ when comparing I88N with mutant P76N in Bonferroni multiple comparison's test of three-four different experiments.

inant effect, whereas mutation to tryptophan (W) or tyrosine (Y) was dominant (Fig. 7A). Interestingly, mutants R92 to aspartate (D) or cysteine (C) were also dominant (Fig. 7A). We hypothesized that the dominant mutants of this residue may have the ability to form novel interactions around this region, maybe distorting the native dimer orientation.

By inspecting in the new dimer model residues near to the position of R92 in the other monomer, we found R96 (Fig. 7B). To test the putative interaction of R92 mutants with R96, we focused on the mutant R92D and then constructed the single

mutant R96D and the double mutant R92D/R96D and assayed its localization at cell-cell junctions (Fig. 7C). Both R92D and R96D mutants showed a defective targeting to cell-cell junctions (Fig. 7C). In contrast, the double mutant R92D-R96D was targeted to cell junctions as the WT protein.

In summary, our results suggest that there is an interaction segment between residues E86 (located on the top of the beta strand) and R92 (found in the bottom) (Fig. 7D). Although residues E86 from each dimer are close, they are stabilized by its interaction with K68. In the bottom edge, opposed residues

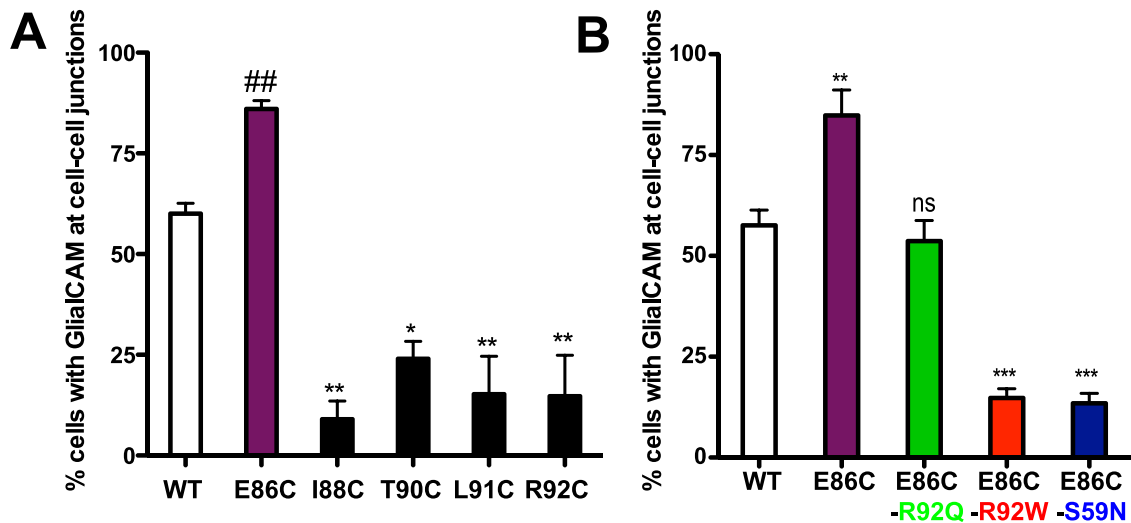


Figure 6. Characterization of the trafficking to cell junctions of GlialCAM cysteine mutants in the interacting segment. (A) Percentage at cell–cell junctions of GlialCAM E86C (230 cells) I88C (177 cells) T90C 185 cells) L91C (123 cells) and R92C (91 cells) compared with GlialCAM WT (198 cells). Graphics represent mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ in Bonferroni multiple comparison test versus WT of three independent experiments. ## $P < 0.01$ in T-student test compared with WT in data from four independent experiments. (B) Quantification of percentage of cells with GlialCAM in cell junctions for WT (101 cells) E86C (94 cells), E86C-p.R92Q (356 cells), E86C-p.R92W (137 cells) and E86C-p.S59N (147 cells). Graphics represent mean \pm SEM. ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ in Bonferroni multiple comparison test, compared with WT. Data from three independent experiments.

R92 may be slightly separated through electrostatic repulsion with R96 (Fig. 7D). The mutation of R92 by charged aspartate can introduce favourable salt bridge with R96 of the other monomer, bringing to a close vicinity this bottom region that in principle was slightly separated in the native protein. Similarly, the introduction of aromatic residues (tryptophan or tyrosine) could introduce novel cation- π interactions with R96, producing similar effect. The dominant effect of R92C might also be explained by the formation of dipole–dipole interactions or by a disulphide bridge, suggesting that GlialCAM may form oligomers of dimers by lateral interactions (see Discussion). Thus, we speculate that residues in this segment that create aberrant neo-interactions, which might be inducing a different dimer orientation, may be dominant.

Discussion

Our aim was to understand why missense mutations from the first Ig domain (IgV), which are found in MLC2 patients, differentially behave as dominant or recessive. The study of most MLC2B missense dominant mutations that have a trafficking defect has revealed that they can be classified in two groups taking into account regarding whether they display or not a reduced ability to interact with the WT protein. Locating both types of MLC2B mutations in a structural model of the extracellular domain of GlialCAM protein developed in the present work, which takes into account homologous structures, docking energetics and biochemical experiments (Fig. 8), suggested that both types of MLC2B mutations affect GlialCAM–GlialCAM interacting interfaces. In one case (D1), they may affect to interactions involved in GlialCAM–GlialCAM cis interfaces, whereas for the other group of mutants (D2), they allegedly affect interactions involved in GlialCAM–GlialCAM trans contacts. As it has been shown in other IgCAM molecules (20,21), GlialCAM dimers may be formed first in the endoplasmic reticulum through cis mediated interactions that then will travel to the plasma membrane where trans

interactions may occur. We suggest that MLC2B mutants that showed normal ability to interact with GlialCAM WT may disrupt specifically GlialCAM–GlialCAM trans mediated interactions, for instance as in the case of the mutants p.S59N and p.D128N, by creating a new glycosylation site in the mentioned trans interaction surface. Possibly, mutant p.Q56P may also disrupt this interaction surface, as proline has a restricted degree of freedom.

Furthermore, GlialCAM is also able to form heterophilic cis interactions with MLC1 or ClC-2. It has been previously shown that, although GlialCAM alone reach cell–cell junctions, co-expression with MLC1 increases the percentage of GlialCAM present at cell–cell junctions. Here, we have found a mutant, E86C that also improves the ability of GlialCAM to reach cell–cell junctions. Based on these studies, we suggest that MLC1 may stabilize GlialCAM at cell–cell junctions by changing the conformation of GlialCAM to a similar configuration as the one caused by the mutation E86C.

We analyzed whether mutation E86C could stabilize MLC2A and MLC2B mutants. As the MLC2B p.S59N mutant was not rescued by E86C, we suggest that mutants E86C and p.S59N influence GlialCAM stability by different mechanisms. Contrarily, the double mutant containing E86C and the MLC2A recessive mutation p.R92Q showed a normal targeting to cell–cell junctions, but the double mutant E86C-R92W failed to reach cell–cell junctions. We believe that the MLC2B mutant p.R92W may destabilize cis interactions in a different manner than the MLC2A mutant p.R92Q, probably by creating novel interactions, as our experiments with the double mutant R92D-R96D suggest. MLC2B mutant p.R92W may also form novel cation- π interactions with the residue R96. Thus, we conclude that MLC2B mutants affecting GlialCAM homooligomerization may affect the interacting segment by disrupting extensively the normal pattern of interactions in this segment, as for example, by creating new interactions or by affecting several interactions simultaneously. Using this model, for instance, we could explain why the recently identified p.R92P mutation in MLC2B Chinese patients (22) may

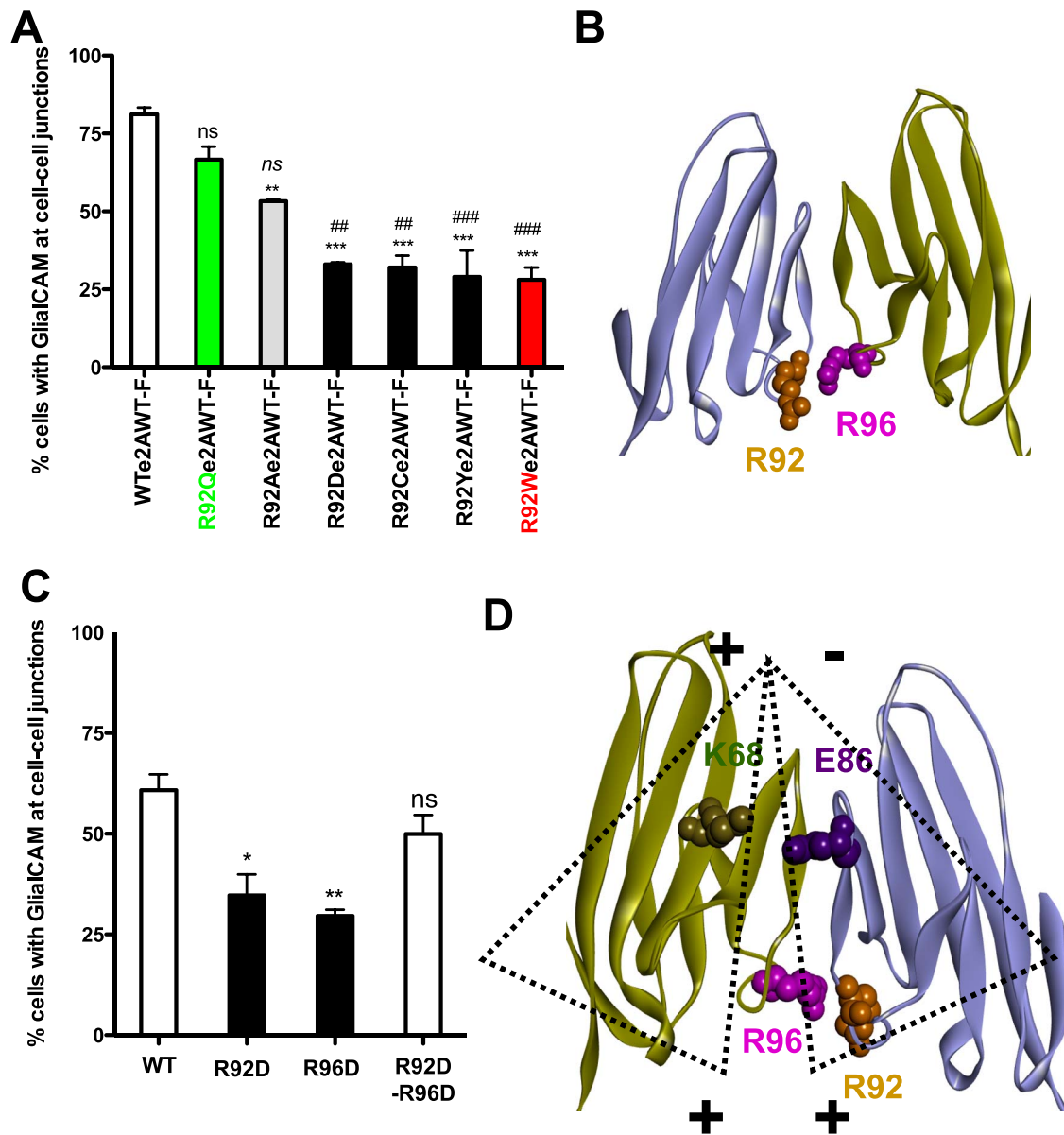


Figure 7. Structural clues on the difference between dominant and recessive mutants at the CIS interacting surface. (A) Biochemical dominance assay of GlialCAM R92 targeting to cell–cell junctions co-expressed with different R92 mutants (left). Quantification of flag-tagged GlialCAM at cell–cell junctions (right) when co-expressed in E2A constructs with GlialCAM WT (130 cells), mutant p.R92Q (115 cells) R92A (94 cells), R92Y (115 cells), R92D (127 cells), R92C (114 cells) and p.R92W (128 cells). Graphics represent mean \pm SEM. ns = no statistical differences, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ when compared with co-expression with the WT. In addition, we also compared with the mutant p.R92Q, to distinguish better between recessive and dominant mutations. ns = no statistical differences, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ when comparing with mutant R92Q in Bonferroni multiple comparison's test of three–four different experiments. (B) Structural representation of the interaction between two IgV domains in CIS, with focus on the possible interactions between the residue R92 and the residue R96. (C) Immunofluorescence of flag-tagged WT and GlialCAM mutants R92D, R96D or double mutant R92D-R96D, where localization at cell–cell junctions is compared with the WT protein. Quantification of percentage of cell–cell junctions in WT (235 cells), R92D (240 cells), R96D (293 cells) or R92D + R96D (278 cells). Graphics represent mean \pm SEM. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$, ns = no statistical differences, in Bonferroni multiple comparison test, compared with WT. Data from three independent experiments. (D) A proposed model of GlialCAM IgV dimerization indicates that dimer is stabilized both by attracting charges at the top of the IgV interacting segment and by repulsive charges at the bottom.

be also dominant. We also hypothesized that the MLC2B mutants p.G89S and p.G89D may also form new interactions through new hydrogen bonds or by electrostatic effects.

As previous studies have revealed (13), efficient targeting of GlialCAM to cell–cell junctions may require multiple interactions of GlialCAM with GlialCAM forming a GlialCAM dimer in the same or in the opposite cell, but also with the cytoskeleton through the C terminus, and with MLC1 or CIC-2 through unknown interacting surfaces. Moreover, recent work has shown

that GlialCAM, MLC1 and CIC-2 may form a ternary complex (23). Considering the volume of the CIC-1 channel (homologous to CIC-2) (24), in the GlialCAM dimer, there is only space for CIC-2, but not for MLC1. Thus, we suggest that GlialCAM dimers may also form lateral interactions with other GlialCAM dimers accommodating CIC-2 or MLC1 within a dimer. The presence of multiple GlialCAM dimers could explain how mutation R92C may be dominant, as the possible formation of a disulphide bridge in one of these different dimers containing two GlialCAM

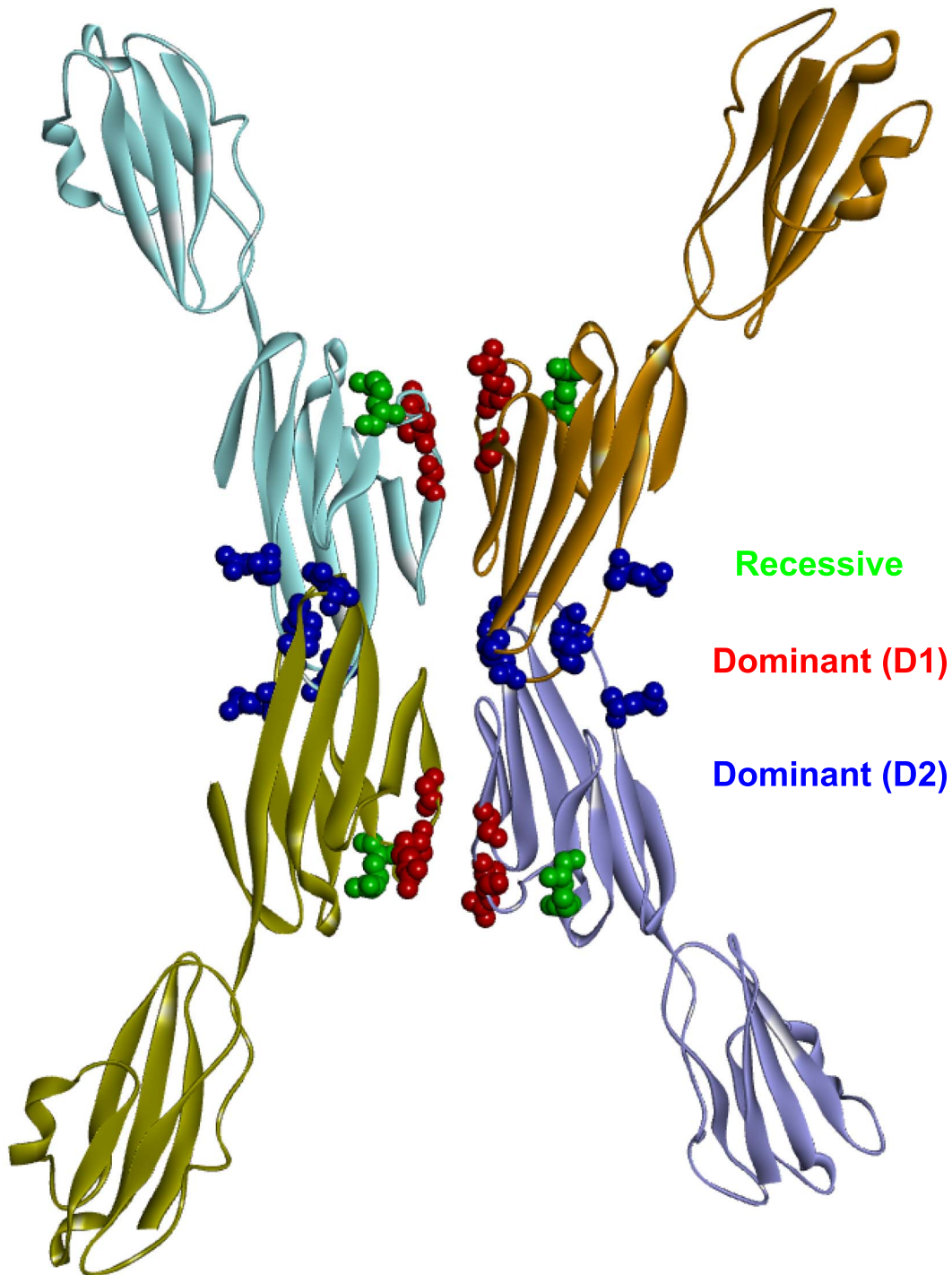


Figure 8. Summary of the structural model proposed for GlialCAM homodimers forming *cis* and *trans* interaction through different surfaces of its IgV domain. *Cis* dimerization is achieved by interactions between two opposing beta-strands of the IgV domain and *trans* interactions occur between salient loops of both IgV domains. Residues mutated in MLC2A patients (recessive) are shown in green, D1 residues mutated in MLC2B patients are shown in red and D2 residues mutated in MLC2B patients are shown in blue. The classification of D1 and D2 mutants has been explained previously.

molecules with R92 mutated to cysteine may destabilize the overall oligomeric organization at the cell junction. It has been shown that other IgCAM molecules similar to GlialCAM have the ability to form lateral interactions that are also important for clustering through IgC2 domains (20). Therefore, maybe some mutations found in MLC2 patients in the IgC2 domain may affect GlialCAM–GlialCAM lateral interactions.

To conclude, our structural model (Fig. 8) of GlialCAM–GlialCAM dimers mediating *cis* and *trans* interactions could be used to predict the behaviour of new MLC2 mutants (22). For instance, the recently identified MLC2A mutation p.T132N is not found in an interacting surface of GlialCAM, so it may be recessive. The other new mutant identified, p.K68M, may destabilize GlialCAM–GlialCAM interaction by affecting its

electrostatic interaction with E86. Since it is not creating a new interaction, we propose it may also be recessive. In summary, this work provides new insights into the molecular basis of *GLIALCAM* mutations. We believe that this knowledge will be important to help developing therapeutic strategies for MLC patients with *GLIALCAM* mutations.

Materials and Methods

Molecular biology

Plasmids were constructed using standard molecular biology techniques employing recombinant PCR and the Multisite Gateway System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). For localization studies, all *GlialCAM* constructs were flag tagged at their C-terminus (three flag copies) and cloned into the pCDNA3 vector. Flag tagged WT *GlialCAM* was co-expressed with different *GlialCAM* mutants by generating constructs where both cDNAs were linked to the self-cleavable 2A peptide (E2A). The sequence of the E2A peptide was: Gly-Ser-Gly-Glu-Gly-Arg-Gly-Ser-Leu-Leu-Thr-Cys-Gly-Asp-Val-Glu-Glu-Asn-Pro-Gly. The integrity of all cloned constructs was confirmed by sequencing. All cDNAs are from human origin. In the results section, mutations found in patients are mentioned using the genetic nomenclature (for instance p.R92W), whereas other mutants simply describe the mutation (for instance E86C).

Cell transfection

HeLa cells were grown in Duplecco's modified Eagle's medium containing (v/v) 10% foetal bovine serum (FBS, Sigma, St Louis, MO, USA) 1% glutamine and 1% penicillin/streptomycin at 37°C in a humidity controlled incubator with 5% CO₂. Cells were transiently transfected with Transfectin Lipid Reagent (Bio-Rad, Madrid, Spain) following the manufacturer's instructions (<https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4106254A.pdf>). Experiments were performed 48–72 h after cell transfection. To assay whether a mutant was acting in a dominant manner, cells were co-transfected with *GlialCAM* WT (or mutant)-E2A- *GlialCAM* WT-flag tagged plus MLC1. This was done to maximize the percentage of *GlialCAM* in cell-cell junctions, as it was previously described that MLC1 improves the percentage of *GlialCAM* in cell-cell junctions (15). In this case, we always detect MLC1 and flag-tagged *GlialCAM* by immunofluorescence and performed our quantitative analyses on *GlialCAM* only on cells that express MLC1. To study the effect of mutations on *GlialCAM* trafficking, *GlialCAM* WT or mutant flag-tagged were transfected independently.

Immunofluorescence of transfected cells

Twenty four hour transfected HeLa cells were split and transferred onto glass coverslips in Petri dishes, and grown for further 24–48 h. Later, cells were fixed with phosphate-buffered saline (PBS) containing 3% paraformaldehyde (PFA) for 20 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 1 h at RT. The antibodies used were mouse anti-flag (1:500) (Sigma) and polyclonal rabbit anti-MLC1 (1:100) (25). Cells were washed and incubated with secondary antibodies for 2 h at RT. Coverslips were mounted in Vectashield medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), with 1.5 µg/mL 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma) and visualized using a DSU spinning disk confocal microscope (Olympus, Tokyo, Japan). Pairs of immunostained cells were analyzed man-

ually to determine whether or not the staining was present in junctions, as described previously (13).

Split-TEV method

The Split-TEV assay was performed exactly as described previously (Lopez-Hernandez *et al.* 2011b; Capdevila-Nortes *et al.* 2012; Jeworutzki *et al.* 2012). Briefly, TEV protease was divided into two fragments: the TEV-N (residues 1–118) and the TEV-C (residues 119–242). TEV-N fragment, the TEV protease recognition site and the chimeric transcription factor GV were fused to the C-terminus of *GlialCAM* WT in a pCDNA3 vector containing a cytomegalovirus promoter. In addition, we fused the TEV-C fragment to the C-terminus of WT or different *GlialCAM* mutants. All proteins with the TEV-C fragments were cloned in a pCDNA6.2/V5-pL Dest, containing the herpes simplex virus thymidine kinase promoter, to obtain low to moderate levels of expression. The non-interacting protein 4F2hc was used as a negative control.

Cysteine crosslinking assays, western-blot and glycosylation analysis

For western blot studies, lysates were prepared by cell homogenization in PBS containing 1% Triton X-100 and protease inhibitors: 1 mM pepstatin and leupeptin, 1 mM aprotinin and 1 mM PMSF, incubated for 1 h at 4°C and centrifuged. Proteins in supernatants were quantified using the BCA Kit (Pierce, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) and mixed with SDS loading sample buffer (LSB4X). When processing samples of proteins that may establish disulphide bonds, samples were prepared with LSB4X without reducing agents and boiled for 3 min at 50°C. In order to confirm the disulphide-bound nature of dimeric proteins, protein extracts were treated with 100 mM DTT in SDS loading sample buffer and boiled at 95°C for 5 min.

Western blot analysis was performed as previously described (26). Membranes were incubated with primary antibodies: anti-Flag (1:500) and anti-beta actin (1:5000, Sigma) and secondary antibodies: HRP-conjugated anti-mouse (1:5000; Jackson).

Evaluation of glycosylation status of *GlialCAM* protein was achieved through denaturing glycosylation assays with PNGase F (New England BioLabs, Ipswich, UK). Protein extracts were denatured by heating at 100°C for 10 min with glycoprotein denaturing buffer and treated with PNGase F enzyme for 1 h at 37°C. Finally, treated samples were prepared with LSB4X and analyzed by western blot.

Obtention of nanobodies and minibodies against *GlialCAM*

The sequence of 139G1 Nb was cloned into the vector pHEN2 that included a hexa-histidine tag at the C-terminus. 139G1 Nb was produced by Hybrigenic Services SAS, Paris, France. Three rounds of phage display selection were carried out using cells expressing *GlialCAM*. Hybrigenics' synthetic hsd2Ab VHH library of 3.109 clones was expressed at the surface of M13 phage. Hybrigenics' phage display allowed selecting VHHs recognizing the non-adsorbed antigen in a native form. Selected VHHs were validated in non-adsorbed Phage ELISA and were then tested in FACS assay. The 139G1 nanobody plasmid was amplified in the *E. coli* WK6 strain (SBRC, Instruct Integrating Biology, Brussel), as described previously (27). In brief, 3–4 individual colonies of the 139G1 Nb were randomly picked, and those were produced as soluble His- and Capture Select C-tagged proteins (MW

12–15 kDa) in the periplasm of *E. coli*. Inducible periplasmic expression of Nb in *E. coli* WK6 strain produced milligramme amounts of >95% pure Nb using immobilized Ni/NTA Agarose resin (Qiagen, Hilden, Germany) from the periplasmic extract of a 1-l culture. Purified Nb (2–10 mg ml⁻¹) in 20 mM Tris-Base, NaCl 150 mM, pH 7.4 were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C before use.

The VHH 139G1 coding sequence was inserted in pFuse plasmid (Hybrigenic Services), which included an Fc fragment of rabbit IgG2. The production of 139G1 Minibody (Mb) VHH 139G1 fused at their C-terminus to the Fc fragment of rabbit IgG2 was carried out in HEK 293 T cells. These cells were grown at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂ in DMEM (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) supplemented with 1 mM sodium pyruvate, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml streptomycin, 100 mg/ml penicillin and 5% (v/v) fetal bovine serum. The cells were seeded on 10 cm culture dishes and transiently transfected with 10 µg of 139G1 Mb using Transfectin reagent (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). At 24 h after the transient transfection, the media was exchanged for a serum-free media, and the cell supernatant was collected 1 day later. The presence of the Mb in this supernatant was confirmed by western blot using an HRP-conjugated anti-rabbit antibody (1:5000; Jackson).

Flow cytometry

For flow cytometry, cells were processed as previously described (26). Cells were transfected with the different GlialCAM IgV mutants into six-well plates. Forty-eight hours after transfection, cells were detached using Trypsin-EDTA 1X (Biological Industries, Kibbutz Beit-Hanemek, Israel) and resuspended in 500 µL of DMEM (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) supplemented with 1 mM sodium pyruvate, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml streptomycin, 100 mg/ml penicillin and 5% (v/v) fetal bovine serum. The following antibodies were used: monoclonal anti-HepaCAM 0.5 mg/ml (1:50; R&D Systems) and the Mb developed in this work 139G1 Mb 0.015 mg/ml (1:1; Hybrigenic Services). These antibodies were added separately to each condition and incubated for 30 min at 4°C. Cells were washed once in 1 mL of 0.2% FBS in PBS and resuspended again in 100 mL of cell culture medium. The secondary antibodies used were: Alexa fluor 488 anti-mouse and Alexa fluor 488 anti-rabbit (1:20; Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA). Secondary antibodies were added and further incubated for 30 min at 4°C. Cells were rinsed once more and resuspended in 1 mL of 0.2% FBS in PBS. To assess viability, propidium iodide was added to a final concentration of 1 mg/ml immediately before FACS analysis, performed with a Cytometre FACS Canto using the following filter sets: 550 bandpass (GFP) and 620/22 (PI). Untransfected cells and unstained transfected cells were used to set the compensation parameters. Data analysis was performed using DIBA software.

Incubation of cells with the 139G1 nanobody

HeLa cells transiently transfected with VFP-tagged GlialCAM WT construct were seeded on coverslips (100.000 cells) and treated with different doses of 139G1 Nb (5, 25 and 50 µg) for 24 h. Cells were then fixed with PBS containing 4% PFA for 20 min and blocked with 10% FBS in PBS for 2 h at RT. Cells were washed three times and coverslips were mounted in Vectashield medium (Vector Laboratories) with 1.5 µg/ml DAPI (Sigma). For the image acquisition, we worked with an Olympus DSU spinning disk confocal microscope. Experiments

were analyzed using ImageJ. Cells incubated with 50 µg with the control nanobody 181Nb (28) were used as a negative control.

Modelling of GlialCAM monomer

A model of extracellular GlialCAM (containing the IgV and IgC2 domains) was built with HHPred (29) based on CAR structure (PDB 3JZ7; 24% SI). There are other available templates for the GlialCAM extracellular domains with 24–30% SI (e.g. 2V5T 24%, 1F97 28%, 3LAF 29%, 3JXA 30%), but none of them yielded better models. Modelling of the IgV alone (with templates 4GOS, 2PKD, 1NEU, 4K55, 3R0N), or using other modelling software (e.g. PSIPRED, genThreader, pDomThreader, pGenThreader, T-coffee), did not improve the models.

Modelling of GlialCAM cis dimer

Previous studies reported a cis dimer orientation that was quite conserved in other members of the CAM family (e.g. nectin-1-EC, CAR) (19). We initially explored whether GlialCAM could adopt the same cis dimeric orientation by superimposing two copies of the monomer model on the corresponding subunits of the CAR dimer (PDB 3JZ7).

However, mutational data and cross-linking experiments did not support the template-based dimer model, so we also modelled the cis dimer by docking, using the monomer model as input. We applied the standard pyDock protocol (30,31). We ran FTDock for exhaustive scanning of protein–protein orientations and then evaluated the energy of the 10000 resulting docking poses with pyDock scoring function. We finally checked all docking models in search for those that satisfied mutational data.

Modelling of GlialCAM trans dimer

During our analysis of homologous structures, we identified a possible template for interactions, between the domains 2 and 3 of contactin (PDB 3JXA) (17). This protein has the highest sequence identity with GlialCAM extracellular domain (30% SI). Therefore, we built *trans* dimer by superimposing two copies of GlialCAM monomer model on contactin domains 2 and 3.

Supplementary Material

Supplementary Material is available at HMG online.

Funding

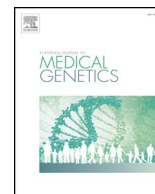
This work was supported in part by the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) (RTI2018-093493-B-I00 to RE) and BIO2016-79930-R to JFR. RE is a recipient of an ICREA Academia prize.

Conflict of Interest: None declared.

References

- van der Knaap, M.S., Schiffmann, R., Mochel, F. et al. (2019) Diagnosis, prognosis, and treatment of leukodystrophies. *Lancet Neurol.*, **18**, 962–972.
- van der Knaap, M.S.S., Boor, I., Estevez, R. et al. (2012) Megaencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: chronic white matter oedema due to a defect in brain ion and water homeostasis. *Lancet Neurol.*, **11**, 973–985.

3. Leegwater, P.A., Yuan, B.Q., van der Steen, J. 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.
4. López-Hernández, T., Ridder, M.C., 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.
5. Hamilton, E.M.C., Cialdella, F., Rappard, V., Di, F. et al. (2018) Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: characterization of disease variants. *Neurology*, **90**, E1395–E1403.
6. Estévez, R., Elorza-Vidal, X., Gaitán-Peñas, H. et al. (2018) Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: a personal biochemical retrospective. *Eur. J. Med. Genet.*, **61**, 50–60.
7. Barrallo-Gimeno, A., Gradogna, A., Zanardi, I. et al. (2015) Regulatory-auxiliary subunits of CLC chloride channel-transport proteins. *Austral. J. Phys.*, **593**, 4111–4127.
8. Bugiani, M., Dubey, M., Breur, M. et al. (2017) Megalencephalic leukoencephalopathy with cysts: the *Glialcam* -null mouse model. *Ann. Clin. Transl. Neurol.*, **4**, 450–465.
9. Hoegg-Beiler, M.B., Sirisi, S., Orozco, I.J. et al. (2014) Disrupting MLC1 and GlialCAM and CLC-2 interactions in leukodystrophy entails glial chloride channel dysfunction. *Nat. Commun.*, **5**, 3475.
10. Capdevila-Nortes, X., López-Hernández, T., Apaja, P.M. 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.
11. Jeworutzki, E., López-Hernández, T., Capdevila-Nortes, X. et al. (2012) GlialCAM, a protein defective in a Leukodystrophy, serves as a CLC-2 cl⁻ channel auxiliary subunit. *Neuron*, **73**, 951–961.
12. Jeworutzki, E., Lagostena, L., Elorza-Vidal, X. et al. (2014) GlialCAM, a CLC-2 cl⁻ channel subunit, activates the slow gate of CLC chloride channels. *Biophys. J.*, **107**, 1105–1116.
13. Capdevila-Nortes, X., Jeworutzki, E., Elorza-Vidal, X. et al. (2015) Structural determinants of interaction, trafficking and function in the CLC-2/MLC1 subunit GlialCAM involved in leukodystrophy. *Austral. J. Phys.*, **593**, 4165–4180.
14. Arnedo, T., López-Hernández, T., Jeworutzki, E. et al. (2014) Functional analyses of mutations in HEPACAM causing megalencephalic leukoencephalopathy. *Hum. Mutat.*, **35**, 1175–1178.
15. López-Hernández, T., Sirisi, S., Capdevila-Nortes, X. et al. (2011) Molecular mechanisms of MLC1 and GLIALCAM mutations in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Hum. Mol. Genet.*, **20**, 3266–3277.
16. Arnedo, T., Aiello, C., Jeworutzki, E. et al. (2014) Expanding the spectrum of megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts in two patients with GLIALCAM mutations. *Neurogenetics*, **15**, 41–48.
17. Bouyain, S. and Watkins, D.J. (2010) The protein tyrosine phosphatases PTPRZ and PTPRG bind to distinct members of the contactin family of neural recognition molecules. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **107**, 2443–2448.
18. Estévez, R. and Jentsch, T.J. (2002) CLC chloride channels: correlating structure with function. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **12**, 531–539.
19. Narita, H., Yamamoto, Y., Suzuki, M. et al. (2011) Crystal structure of the cis-dimer of Nectin-1. *J. Biol. Chem.*, **286**, 12659–12669.
20. Kamiguchi, H. and Lemmon, V. (2000) IgCAMs: bidirectional signals underlying neurite growth. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **12**, 598–605.
21. Matthäus, C., Langhorst, H., Schütz, L. et al. (2017) Cell-cell communication mediated by the CAR subgroup of immunoglobulin cell adhesion molecules in health and disease. *Mol. Cell. Neurosci.*, **81**, 32–40.
22. Shi, Z., Yan, H.-F., Cao, B.-B. et al. (2019) Identification in Chinese patients with GLIALCAM mutations of megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts and brain pathological study on Glialcam knock-in mouse models. *World J. Pediatr.*, **15**, 454–464.
23. Sirisi, S., Elorza-Vidal, X., Arnedo, T. 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.
24. Wang, K., Preisler, S.S., Zhang, L. et al. (2019) Structure of the human CLC-1 chloride channel. *PLOS Biol.*, **e3000218**, 17.
25. Teijido, O., Casaroli-Marano, R., Kharkovets, T. et al. (2007) Expression patterns of MLC1 protein in the central and peripheral nervous systems. *Neurobiol. Dis.*, **26**, 532–545.
26. Teijido, O., Martínez, A., Pusch, M. et al. (2004) Localization and functional analyses of the MLC1 protein involved in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Hum. Mol. Genet.*, **13**, 2581–2594.
27. Pardon, E., Laeremans, T., Triest, S. et al. (2014) A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology. *Nat. Protoc.*, **9**, 674–693.
28. Errasti-Murugarren, E., Fort, J., Bartoccioni, P. et al. (2019) L amino acid transporter structure and molecular bases for the asymmetry of substrate interaction. *Nat. Commun.*, **10**, 1807.
29. Soding, J., Biegert, A. and Lupas, A.N. (2005) The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Res.*, **33**, W244–W248.
30. Cheng, T.M.-K., Blundell, T.L. and Fernandez-Recio, J. (2007) pyDock: electrostatics and desolvation for effective scoring of rigid-body protein-protein docking. *Proteins*, **68**, 503–515.
31. Jiménez-García, B., Pons, C. and Fernández-Recio, J. (2013) pyDockWEB: a web server for rigid-body protein-protein docking using electrostatics and desolvation scoring. *Bioinformatics*, **29**, 1698–1699.



Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: A personal biochemical retrospective

Raúl Estévez^{a,c,*}, Xabier Elorza-Vidal^{a,c}, Héctor Gaitán-Peñas^{a,c}, Carla Pérez-Rius^a, Mercedes Armand-Ugón^a, Marta Alonso-Gardón^a, Efrén Xicoy-Espauella^a, Sònia Sirisi^{a,b,c}, Tanit Arnedo^{a,c}, Xavier Capdevila-Nortes^a, Tania López-Hernández^a, Marisol Montolio^a, Anna Duarri^{a,b}, Oscar Tejido^a, Alejandro Barrallo-Gimeno^{a,c}, Manuel Palacín^{c,d}, Virginia Nunes^{b,c}

^a Unitat de Fisiologia, Departament de Ciències Fisiològiques, IDIBELL-Institute of Neurosciences, Universitat de Barcelona, L'Hospitalet de Llobregat, Spain

^b Unitat de Genètica, Departament de Ciències Fisiològiques, Laboratori de Genètica Molecular, IDIBELL-Universitat de Barcelona, L'Hospitalet de Llobregat, Spain

^c Centro de Investigación en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, Spain

^d Institute for Research in Biomedicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Leukodystrophy
MLC1
GlialCAM
ClC-2
Astrocyte

ABSTRACT

Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (MLC) is a rare type of leukodystrophy characterized by dysfunction of the role of glial cells in controlling brain fluid and ion homeostasis. Patients affected by MLC present macrocephaly, cysts and white matter vacuolation, which lead to motor and cognitive impairments. To date, there is no treatment for MLC, only supportive care. MLC is caused by mutations in the *MLC1* and *GLIALCAM* genes. *MLC1* is a membrane protein with low identity to the Kv1.1 potassium channel and *GlialCAM* belongs to an adhesion molecule family. Both proteins form a complex with an as-yet-unknown function that is expressed mainly in the astrocytes surrounding the blood–brain barrier and in Bergmann glia. *GlialCAM* also acts as an auxiliary subunit of the chloride channel *ClC-2*, thus regulating its localization at cell–cell junctions and modifying its functional properties by affecting the common gate of *ClC-2*. Recent studies in *Mlc1*-, *GlialCAM*- and *Clcn2*-knockout mice or *Mlc1*-knockout zebrafish have provided fresh insight into the pathophysiology of MLC and further details about the molecular interactions between these three proteins. Additional studies have shown that *GlialCAM/MLC1* also regulates other ion channels (TRPV4, VRAC) or transporters (Na⁺/K⁺-ATPase) in a not-understood manner. Furthermore, it has been shown that *GlialCAM/MLC1* may influence signal transduction mechanisms, thereby affecting other proteins not related with transport such as the EGF receptor. Here, we offer a personal biochemical retrospective of the work that has been performed to gain knowledge of the pathophysiology of MLC, and we discuss future strategies that may be used to identify therapeutic solutions for MLC patients.

1. Introduction

Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (MLC; MIM 604004) is a white matter disorder associated primarily with myelin and astrocyte vacuolation (van der Knaap et al., 2012). It is an infantile-onset hereditary disease characterized by early-onset macrocephaly (van der Knaap et al., 1995a). Magnetic resonance imaging (MRI) is used to diagnose the disease in childhood (van der Knaap et al., 1995b). Brain MRI shows diffuse signal abnormality and swelling of the cerebral white matter and the presence of subcortical cysts, mainly in

the anterior temporal regions (Singhal et al., 1996). Clinically, MLC patients present deterioration of motor functions with ataxia and spasticity, epileptic seizures and mental decline. In contrast to other leukodystrophies, MLC progresses very slowly, but minor head trauma and common infections exacerbate clinical conditions (van der Knaap et al., 2012). Many factors seem to affect the severity of the disease; even siblings with the same mutation may present differences in its phenotypic expression of the disease (Pascual-Castroviejo et al., 2005). Other patients have been shown to present a similar clinical picture at first, but subsequent MRIs have shown an improvement or even

* Corresponding author. Facultat de Medicina, Departament de Ciències Fisiològiques, Universitat de Barcelona-IDIBELL, C/Feixa Llarga, s/n 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain.

E-mail address: restevez@ub.edu (R. Estévez).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmg.2017.10.013>

Received 21 July 2017; Received in revised form 14 September 2017; Accepted 22 October 2017

Available online 25 October 2017

1769-7212/ © 2017 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

normalization (van der Knaap et al., 2010). This phenotype has been called MLC2B (MIM 613926), and these patients may present different phenotypes that range from a transient benign form of MLC to macrocephaly and mental retardation with or without autism (Lopez-Hernandez et al., 2011a).

In the 1990s, it was hypothesized that the MRI pattern recognition of white matter disorders could be used to classify leukodystrophies and also to identify the genes involved (van der Knaap et al., 1991). Although this method is now recognized as standard (van der Knaap and Bugiani, 2017), it revolutionized the field of white matter disorders. This technique was used in genetic linkage studies to identify the first gene locus for MLC associated to an autosomal recessive trait (Topcu et al., 2000) and, subsequently, the disease gene, which was named *MLC1* (Leegwater et al., 2001). *MLC1* mutations were detected in most MLC patients (about 80% of patients) (Ilja Boor et al., 2006; Leegwater et al., 2002; Riel-Romero et al., 2005; Yuzbasioglu et al., 2011; Kariminejad et al., 2015; Xie et al., 2012; Montagna et al., 2006; Wang et al., 2011), but some families did not present linkage to the *MLC1* locus (about 20% of patients), thus indicating genetic heterogeneity (Patrono et al., 2003; Blattner et al., 2003). Since *Clcn2* knockout mice show myelin vacuolation similar to that of MLC patients (Blanz et al., 2007), *CLCN2* mutations were screened in those patients without linkage to *MLC1*, but no pathogenic mutations were identified (Scheper et al., 2010). While looking for *MLC1*-interacting proteins, our group identified GlialCAM as the most abundant protein to interact with *MLC1* (Lopez-Hernandez et al., 2011a). Subsequently, the analysis of the *GLIALCAM* gene (also called *HEPACAM*) in MLC patients without *MLC1* mutations identified pathogenic mutations with recessive inheritance in those MLC2A patients (Lopez-Hernandez et al., 2011a). Furthermore, mutations with a dominant inheritance in *GLIALCAM* were also identified in MLC2B patients (Lopez-Hernandez et al., 2011a).

In this review, we offer a biochemical retrospective of the molecular pathogenesis of MLC. Readers are asked to consult other recent reviews for the clinical aspects of the disease (van der Knaap and Bugiani, 2017; Schiffmann and van der Knaap, 2004; Kaye, 2001; Brignone et al., 2015).

2. Biochemical studies of the *MLC1* protein

MLC1 encodes a membrane protein of still unknown function also known as MLC1. DNA databases provide clues that shed light on the function of novel genes (Nomura et al., 1994). *MLC1* orthologues are found only in vertebrates, including the zebrafish, which has a single orthologue (Sirisi et al., 2014). Sequence comparison between all orthologues revealed that amino acids are more conserved in the putative eight transmembrane (TM) domains, including residues that are mutated in patients (Figs. S1 and 1A), and in the terminal part of the C-terminus that contains a stretch of three bulky hydrophobic valines (Fig. S1). Immunofluorescence experiments using antibodies directed against the N- or C-terminus indicated that both segments are intracellular (Boor et al., 2005; Tejjido et al., 2004). Amino acid sequence analysis suggested that the *MLC1* gene might have evolved from a gene duplication of a minigene containing the first four TM domains. This can clearly be seen, as the predicted fourth and eighth TM segments contain a stretch of poly-leucine residues and the intracellular loop between TM segments 4 and 5 is not conserved among the different orthologues (Fig. S1). If we co-express in *Xenopus* oocytes the N- and C-terminal parts of *MLC1* that has been split between TM segments 4 and 5, both parts are able to arrive to the plasma membrane (Fig. 1B), thus indicating that these two halves may interact with each other, probably through these poly-leucine stretches, as occurs with other membrane proteins (Gurezka et al., 1999). These experiments also indicated that the loops before TM4 and TM8 are extracellular. In addition to this internal oligomerization, we have conducted many different biochemical experiments, such as co-immunoprecipitation of differently tagged

MLC1 subunits, enhanced trafficking assays (Tejjido et al., 2004) and split-TEV (tobacco etch protease) (Capdevila-Nortes et al., 2012), which show that *MLC1* may homo-oligomerize (Fig. 1C). This type of biochemical behaviour is found in many ion channel proteins (Fig. 1D) (Park et al., 2016). In line with this finding, *MLC1* presents low identity (< 20% amino acid identity) with the potassium channel Kv1.1, which is involved in ataxia (Fig. S2). Furthermore, MLC patients may present epilepsy, which is typical in diseases caused by ion channel protein mutations (Haj-Yasein et al., 2011), but not in leukodystrophies. *MLC1* also has the signature of ABC-2 type transporters and sodium-galactose transporters, thus suggesting it could be a transport protein. On the other hand, a PROSITE search also indicates that *MLC1* contains a signature motif of the ribosomal protein S14 subunit that starts in the middle of transmembrane 2 and the beginning of the first intracellular loop (Fig. S1). However, it has been suggested that this motif is a false positive (Leegwater et al., 2001). Whether *MLC1* plays a role in protein translation has not yet been investigated.

In light of all this evidence, the first theory regarding the possible function of *MLC1* is that it could act as an ion channel. To test this hypothesis, we expressed *MLC1* in *Xenopus* oocytes and HEK293 cells and performed voltage-clamp or patch-clamp measurements using different voltage protocols under normal conditions or after adding activating compounds, but no currents that could be assigned to *MLC1* were detected (Tejjido et al., 2004). It is important to note that we verified that the protein was expressed at the plasma membrane alone (Tejjido et al., 2004). We also co-expressed *MLC1* with the potassium channel Kv1.1 (Tejjido et al., 2004) or with the potassium channel Kir4.1 (since both are expressed in the same cells) (Tejjido et al., 2007), but no changes were observed after co-expression with *MLC1*. As is always the case in science, a negative result does not mean that this hypothesis is wrong. Since many ion channels need accessory subunits in order to be functional (Estevez et al., 2001), our interpretation at the time was that an *MLC1*-accessory subunit could be required to express ion channel activity, which was consistent with the fact that some MLC patients do not have mutations in *MLC1* (van der Knaap et al., 2010).

3. Identification of *GLIALCAM* as a second MLC gene

Six years ago, before NGS (Next generation sequencing) experiments represented standard methods (Fernández-Marmiesse et al., 2017), the search for new MLC genes was performed through genetic-linkage studies. However, this approach proved unsuccessful. Viewed retrospectively, this problem could have been solved actually very easily by sequencing patients' genome. At that time, our strategy was to identify *MLC1*-interacting proteins as candidate genes for MLC. Two types of experiments were performed: a split-ubiquitin yeast two-hybrid assay to test for membrane proteins (results are ongoing) and identification by mass-spectrometry of *MLC1*-associated proteins by affinity purification using antibodies directed against *MLC1* (Lopez-Hernandez et al., 2011a). Our first, somewhat naive idea was that proteins that appeared in both methods were probably true *MLC1*-interacting proteins. Our initial results were very discouraging, as no protein appeared in both methods. Two experimental changes were key to the successful identification of GlialCAM as an *MLC1*-interacting protein. First, we decided to repeat affinity purification experiments using another detergent, since we suspected that the interaction could be sensitive to detergent, as is the case with, for example, cholesterol metabolism-related proteins (Yang et al., 2002). In fact, only a few detergents such as digitonin maintained this interaction (Fig. 2A). The sensitivity of the interaction of both proteins to detergents may explain why other groups did not identify GlialCAM as an *MLC1*-interacting protein (Sugio et al., 2017). The second key modification was to apply new protein quantification methods based on the peptide signal intensities that were extracted (Zolles et al., 2009; Muller et al., 2010; Bildl et al., 2012). This allowed us to conclude that GlialCAM had the second highest yield (after *MLC1*) in all affinity purifications (Lopez-Hernandez et al.,

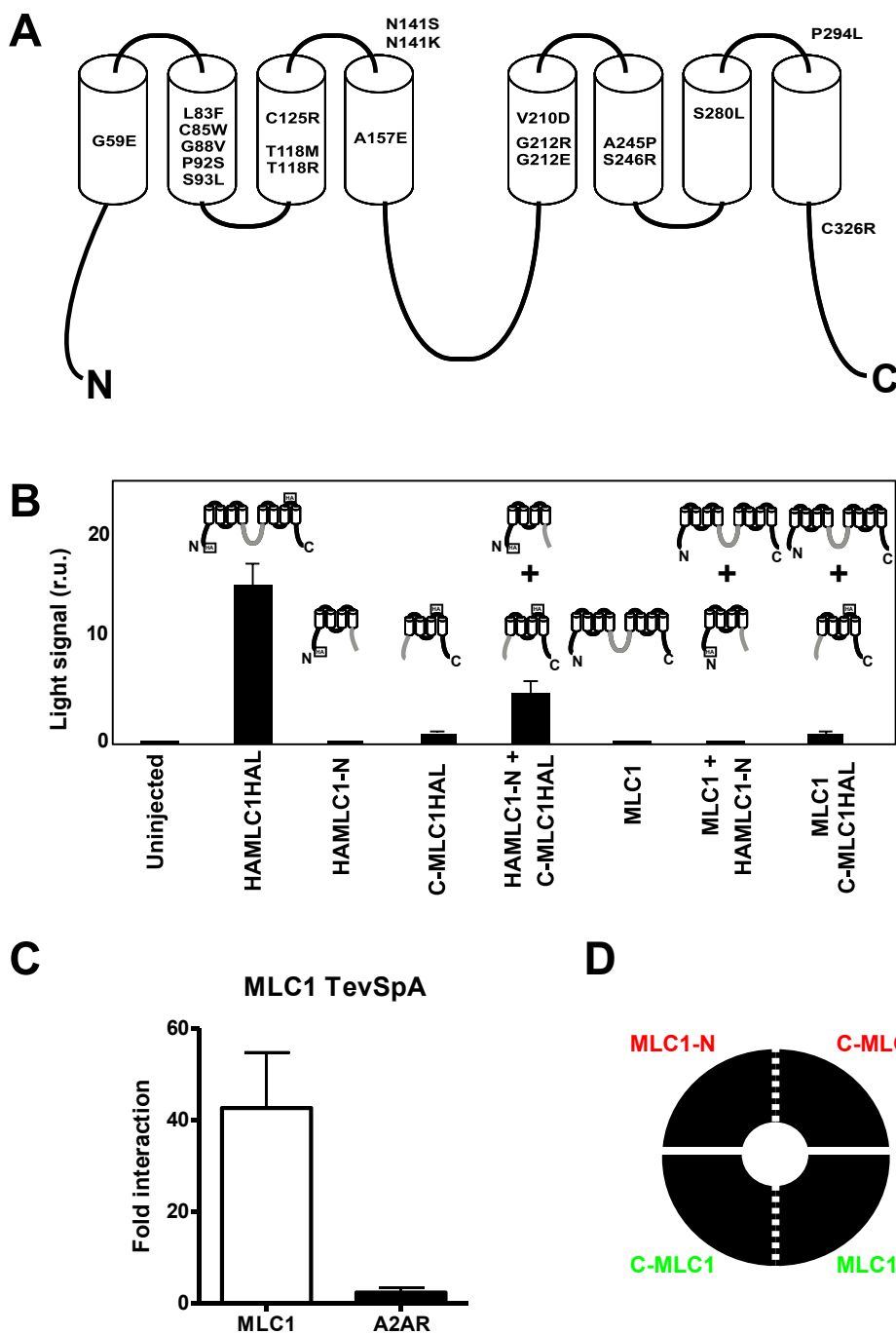


Fig. 1. Biochemical features of the MLC1 protein. A) A scheme of the MLC1 molecule, showing the predicted 8 transmembrane (TM) segments. The N- and C-terminal are intracellular. Some of the mutations identified in MLC patients and characterized (Duarri et al., 2008) are shown. The position of the N and the C termini are indicated. B) MLC1 surface expression can be reconstituted by expressing separately two halves of the MLC1 protein (HAMLC1-N + C-MLC1HAL). MLC1 has been split at the intracellular loop between TM segments 4 and 5 (in grey). Surface expression was determined by a luminescence-based assay, detecting the HA epitope tag (HAL), which is inserted in the extracellular loop between TM segments 7 and 8. In contrast, expression of full-length MLC1 (without HA tags) does not improve surface expression of the C-terminal half of MLC1, suggesting that these halves in the full-length MLC1 are not free to interact with split MLC1. For clarity, a scheme of each of the constructs expressed in *Xenopus* oocytes is provided and we indicated the N and C termini of full-length MLC1. The experiments were repeated at least twice. C) Example of typical split-TEV experiments used to detect interactions between MLC1 molecules. The A2A receptor is used as a negative control. D) A schematic model of MLC1 putative quaternary structure that integrates the results obtained in B (split MLC1, dotted lined) and in C (homo-oligomerization). We considered an antiparallel structure, as this is usually found in ion channels (Park et al., 2016). We imagined that a central pore could be formed by elements of each group of four transmembrane segments.

2011a). Importantly, an estimate of the abundance of the interacting protein suggested that both proteins directly interact (Lopez-Hernandez et al., 2011a). Marjo van der Knaap's research group identified two mutations in *GLIALCAM* (inherited in a recessive form) in MLC2A patients and one *GLIALCAM* mutation (inherited in a dominant form) in MLC2B patients (Lopez-Hernandez et al., 2011a) (Fig. 2B). Thus, this friendly collaboration between a biochemical group and a genetic group yielded exciting results.

GlialCAM (Glial cell adhesion molecule) is a type-I transmembrane protein (N-terminus extracellular, due to the presence of a signal peptide) that contains two immunoglobulin (Ig)-like domains (Fig. 2B). The domain proximal to the transmembrane domain is C2 type and the more distant domain is V-type. The C-terminus contains many phosphorylation sites and is also very rich in proline residues (Fig. S3).

GlialCAM was originally identified as a silenced gene in human hepatocellular carcinoma (hence the reason for the name HepaCAM), suggesting that it could act as a tumour suppressor (Chung Moh et al., 2005). A very low expression of GlialCAM was found in the liver, and GlialCAM knockout mice do not show any evidence of having an increased incidence of tumours (Hoegg-Beiler et al., 2014).

The fact that GlialCAM and MLC1 directly interact was demonstrated following the *in vitro* expression of both cDNAs in a heterologous system such as HeLa or HEK cells (Lopez-Hernandez et al., 2011b). Thus, different methods such as co-immunoprecipitation between differentially tagged GlialCAM or MLC1 proteins, FRET (fluorescence resonance energy transfer), BRET (bioluminescence resonance energy transfer) and split-TEV indicated that the interaction between both proteins is direct (Lopez-Hernandez et al., 2011b) (Fig. 2C).

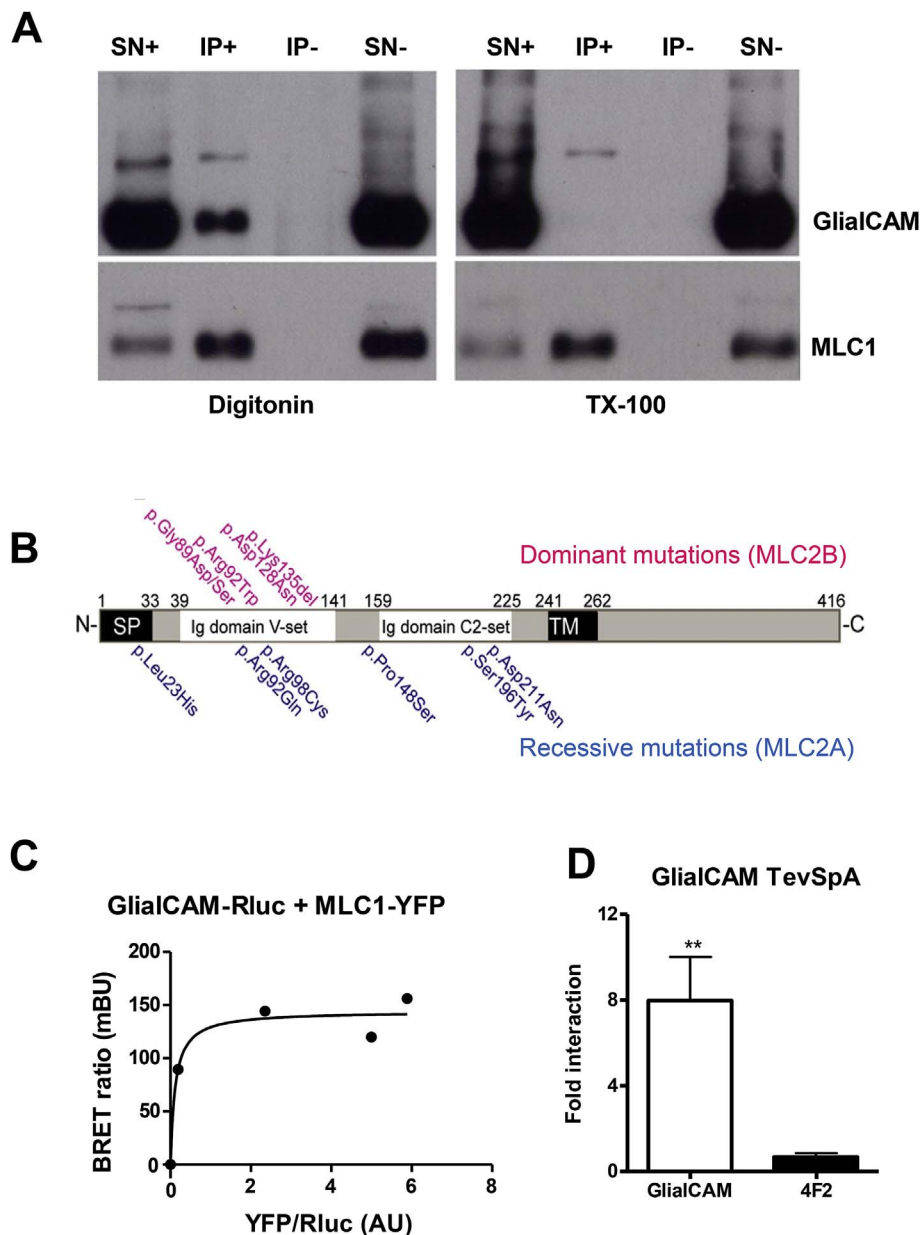


Fig. 2. Identification of GlialCAM as an MLC1-interacting protein and as a second MLC gene. A) Co-immunoprecipitation of mouse brain membrane proteins using a monoclonal antibody directed against MLC1. Proteins were solubilized in PBS1x, 150 mM NaCl and 1% detergent (digitonin or Triton X-100) at a 1:10 protein/detergent ratio. A Western blot was performed with rabbit polyclonal antibodies detecting GlialCAM or MLC1. B) Schematic structure of GlialCAM indicating the positions of the signal peptide (SP), IgV, IgC2 and transmembrane segment (TM). Some of the mutations found in MLC2B and MLC2A patients are also indicated. C) Interaction of MLC1 with GlialCAM detected by BRET (bioluminescence resonance energy transfer). Cells expressing a constant amount of GlialCAM-Rluc (donor) with increasing amounts of MLC1-YFP (acceptor) are incubated with the luciferase substrate and the BRET signal is detected using a luminometer. The levels of MLC1-YFP are determined by measuring the fluorescence levels of YFP. The levels of GlialCAM-Rluc are determined by measuring the luminescence signal 10 min after adding the substrate. The BRET ratio is the acceptor emission at 527 nm relative to the donor emission at 475 nm 1 min after adding the substrate. Due to the overlap of the emission spectra, it is necessary to subtract the light detected at 527 nm that is contributed by the donor emission, which is calculated in cells expressing only GlialCAM-Rluc. The saturation of the curve indicates that the interaction is not due to random collisions. Similar results have been found by FRET (Förster resonance energy transfer). D) Typical example of split-TEV experiments used to detect interactions between GlialCAM molecules. The 4F2 molecule is used as a negative control.

Furthermore, GlialCAM co-expression changed the subcellular localization of MLC1 from the endoplasmic reticulum/plasma membrane and concentrated it in cell–cell junctions in heterologous cells (Lopez-Hernandez et al., 2011a, 2011b). Analysis of deletions and chimeric GlialCAM proteins suggested that the extracellular domain of GlialCAM is necessary for both cell junction targeting and mediating interactions with MLC1 (Capdevila-Nortes et al., 2015). The confinement of MLC1 in cell–cell junctions by GlialCAM *in vitro* recapitulates the MLC1 expression observed in astrocyte–astrocyte junctions in primary astrocytes or in tissue by EM (electron microscopy) Immunogold (Tejido et al., 2007; Duarri et al., 2011) (Fig. 3A). It should be noted that EM Immunogold is the only method that is resolute enough to address the localization of MLC1 in tissue, since other methods such as confocal microscopy and post-embedding EM may yield ambiguous results in the tiny membranes of the astrocytic endfeet, where MLC1 is mostly located (Boor et al., 2005; Tejido et al., 2004; Bugiani et al., 2017; Dubey et al., 2015; Ambrosini et al., 2008) (Fig. 3A). Studies by confocal microscopy in Bergmann glia represent an alternative approach, as they possess long, straight processes (Tejido et al., 2004).

In summary, we obtained bona-fide genetic and biochemical

evidence that indicated that GlialCAM is a subunit of MLC1 required for its confinement at cell junctions. We then tried to measure currents in *Xenopus* oocytes and HEK cells, but no currents were observed (unpublished results). Thus, our hypothesis that a missing subunit may be required for the functional expression of MLC1 was therefore disproved. We then decided to perform some biochemical experiments to address the role of GlialCAM in MLC1 cell biology. Unexpectedly, a lack of GlialCAM caused by RNA interference in primary astrocytes or knockout mice not only abolished MLC1 localization at junctions, but also dramatically reduced the total expression of MLC1 and its localization at the plasma membrane (Hoegg-Beiler et al., 2014; Bugiani et al., 2017; Capdevila-Nortes et al., 2013). These results allowed us to conclude that GlialCAM is an essential MLC1 subunit that acts as a chaperone to ensure that MLC1 reaches the plasma membrane and concentrates at cell–cell junctions. Why, then, does overexpressed MLC1 reach the plasma membrane in heterologous cell lines? Our explanation was that low GlialCAM expression levels (even those not detected by western blot) are enough to rescue MLC1 retention in the endoplasmic reticulum (ER) (Capdevila-Nortes et al., 2013). On the other hand, the overexpression of MLC1 may saturate a possible ER

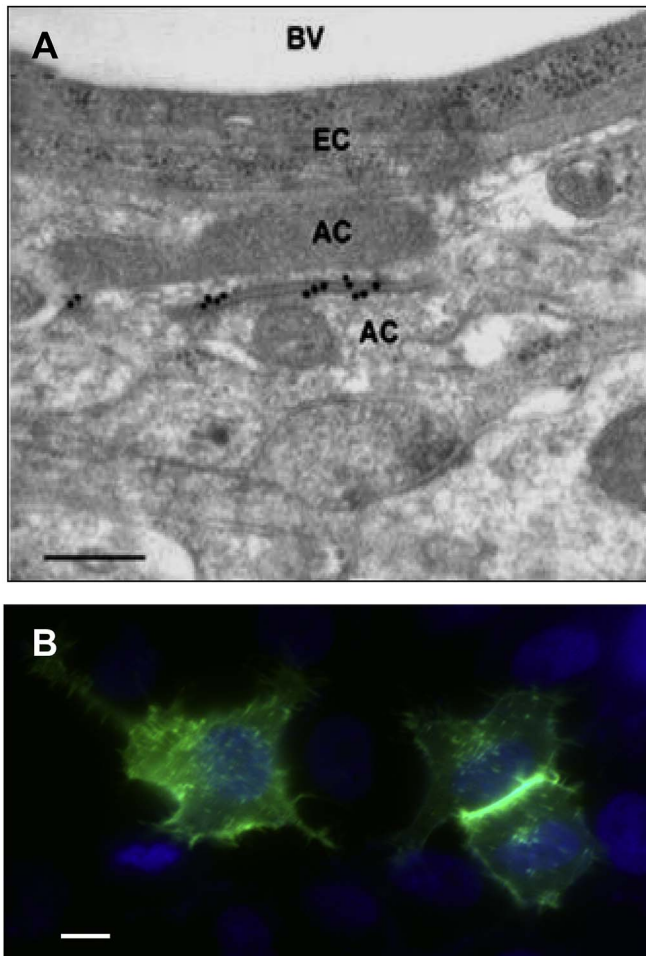


Fig. 3. Localization of MLC1 at astrocyte–astrocyte junctions is determined by GlialCAM-mediated transinteractions. **A)** Example of immunolabelling showing the localization of MLC1 (18 nm gold particles) at astrocyte–astrocyte junctions in mouse tissue. No gold particles were observed in endothelial–astrocyte junctions. Scale bar: 500 nm. **B)** Localization of GlialCAM in cell junctions depends on GlialCAM transinteractions. Thus, single-transfected cells are not located in junctions whereas junctional localization is observed in double-transfected cells. Scale bar: 20 μ m. MLC1 requires co-expression with GlialCAM in order to reach cell–cell junctions.

retention mechanism that may operate on MLC1 and is not associated with GlialCAM. *In vitro*, the confinement of MLC1 to cell–cell junctions depends on the expression levels of GlialCAM, which is observed only at high expression levels (Capdevila-Nortes et al., 2013).

Several GlialCAM protein properties are crucial to its capacity to concentrate at cell–cell junctions. First, GlialCAM homo-oligomerizes with itself through the extracellular domain, as revealed by split-TEV (Lopez-Hernandez et al., 2011b) (Fig. 2D). This homo-oligomerization seems to be important for the role of the C-terminus in localization at cell–cell junctions (Capdevila-Nortes et al., 2015). The C-terminus probably mediates interactions with the cytoskeletal actin network (Moh et al., 2009a). On the other hand, the extracellular domain of GlialCAM also interacts homophilically in trans through the extracellular domain (Hoegg-Beiler et al., 2014; Capdevila-Nortes et al., 2015), as can be seen in single- or double-transfected pairs with GlialCAM: GlialCAM was located at cell–cell junctions in only the double-transfected cells (Fig. 3B). Cis-homo-oligomerization seems to be required for the establishment of sufficient trans-homophilic interactions, as observed in mutants found in MLC (see below) (Lopez-Hernandez et al., 2011b). GlialCAM do not interact in trans with MLC1, as demonstrated by experiments in which cells independently transfected with GlialCAM or MLC1 were mixed (Hoegg-Beiler et al., 2014).

Although GlialCAM concentrates at cell–cell junctions when

expressed alone in cell lines, MLC1 also increased the proportion of GlialCAM present at junctions, thus suggesting that MLC1 may favour the formation of GlialCAM and thereby increase its propensity to localize at cell–cell junctions (Lopez-Hernandez et al., 2011b). One of the many unexpected findings associated with MLC is that a lack of MLC1 in knockout zebrafish (Sirisi et al., 2014), knockout mice (Hoegg-Beiler et al., 2014; Dubey et al., 2015) and in a MLC patient (Sirisi et al., 2014) leads to GlialCAM mislocalization. Surprisingly, GlialCAM mislocalization was not observed in primary astrocytes from *Mlc1* knockout mice (Sirisi et al., 2014). However, the application of a depolarizing solution containing extracellular potassium causes GlialCAM mislocalization in astrocytes from *Mlc1* knockout mice, but not in wild-type astrocytes (Sirisi et al., 2014), recapitulating the biochemical defect observed *in vivo*. This suggests that this GlialCAM trafficking process may depend on MLC1 function and perhaps extracellular potassium levels, which may be linked to increased neuronal activity. It could also be that in primary astrocytes in basal conditions MLC1 is not working properly, although functional defects have also been observed in primary astrocytes in basal or in hypotonic conditions, suggesting that this is not the case. Clarification regarding the mechanistic details underlying the internalization of GlialCAM in *Mlc1* knockout mice is still required.

4. GlialCAM/MLC1 directly regulates the function of chloride channel ClC-2 in glial cells

For the interaction of GlialCAM and MLC1 to be physiologically relevant, both proteins must co-localize in native tissue. This was in fact the case in the astrocytic endfeet or Bergmann glia (Lopez-Hernandez et al., 2011a), but GlialCAM was also detected in oligodendrocytes (Favre-Kontula et al., 2008), where MLC1 is not present. This suggested that GlialCAM might interact with other proteins in this cell type. Quantitative mass spectroscopy of GlialCAM-interacting proteins identified mostly peptides from GlialCAM and MLC1, but also from the chloride channel ClC-2 (Barrallo-Gimeno et al., 2015a; Jeworutzki et al., 2012). ClC-2 is expressed in neurons, astrocytes and oligodendrocytes (Blanz et al., 2007; Jentsch et al., 2002; Ratte and Prescott, 2011; Sik et al., 2000; Nobile et al., 2000). The interaction between GlialCAM and ClC-2 was also direct, as demonstrated after both proteins were expressed in cell lines by co-immunoprecipitation and split-TEV (Jeworutzki et al., 2012). As occurs with MLC1, GlialCAM directs ClC-2 to cell–cell junctions and, more importantly, modifies the functional properties of the ClC-2-mediated current (see below).

By contrast, the co-expression of MLC1 with ClC-2 does not modify the functional properties of ClC-2. Moreover, when the same anti-MLC1 polyclonal antibodies used to co-immunoprecipitate GlialCAM were used, no ClC-2 was purified, which suggested that GlialCAM/ClC-2 and GlialCAM/MLC1 were independent complexes (Lopez-Hernandez et al., 2011a). However, this view has recently changed. A newly developed mouse monoclonal anti-MLC1 antibody was used to co-precipitate ClC-2 and GlialCAM (Sirisi et al., 2017a). Furthermore, the immunoprecipitation of ClC-2 using anti-GlialCAM antibodies on brain membranes from *Mlc1*-KO was dramatically reduced (Sirisi et al., 2017a). These new results together with proximity ligation experiments in primary astrocytes (Sirisi et al., 2017a) suggest that, in astrocytes, GlialCAM, MLC1 and ClC-2 may form a ternary complex in which GlialCAM acts as a bridge between ClC-2 and MLC1 (Fig. 4).

Importantly, in *Xenopus* oocytes, transfected HEK293 cells (Jeworutzki et al., 2012) and oligodendrocytes *in vivo* (Hoegg-Beiler et al., 2014), GlialCAM modifies the functional properties of the ClC-2-mediated Cl⁻ current, thus increasing current amplitudes and changing activation and rectification properties by affecting the common gate that operates in both protomers of the ClC channels (Jeworutzki et al., 2014). It seems that the first three amino acids (Ser-Leu-Tyr) of the transmembrane segment of GlialCAM are essential for the activation of ClC-2 currents, but not for targeting or biochemical interactions

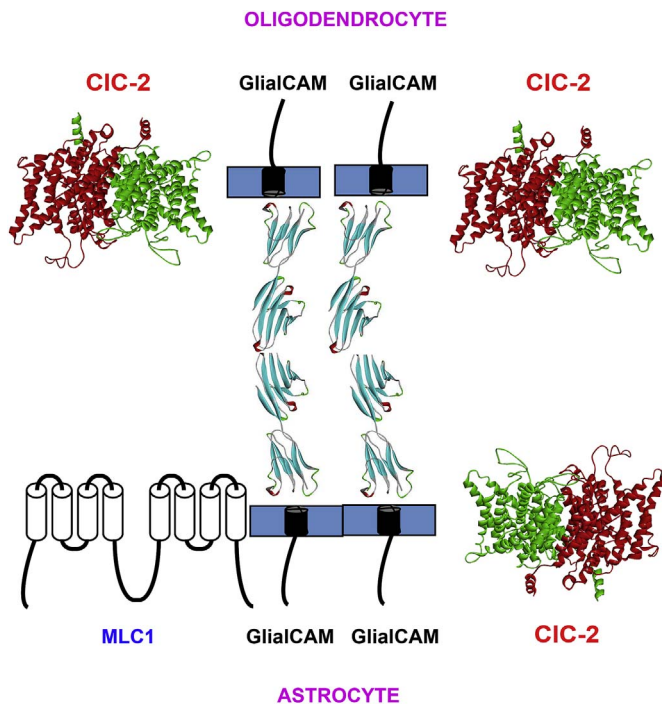


Fig. 4. Model of the complex formed between GlialCAM, MLC1 and CIC-2 in junctions between astrocytes and oligodendrocytes. GlialCAM, MLC1 and CIC-2 form homo-oligomers, in the case of CIC-2 dimers, as shown in the crystal structure of a mammalian CIC-K channel. MLC1 is an astrocytic protein, whereas GlialCAM and CIC-2 are found in astrocytes and oligodendrocytes. GlialCAM is capable of interacting in trans with GlialCAM molecules from other cells (in this case oligodendrocytes, but the model can also be extrapolated to astrocyte–astrocyte junctions). In addition, GlialCAM is capable of hetero-oligomerizing with MLC1 and CIC-2 in a different manner: it is an obligatory subunit for MLC1, as it is needed for its endoplasmic reticulum exit and its plasma membrane/junctional localization. In the case of CIC-2, it works as an auxiliary subunit, as expression at the plasma membrane does not depend on GlialCAM but its expression at cell junctions depends on GlialCAM. Thus, a lack of GlialCAM causes MLC1 and CIC-2 mislocalization. A lack of MLC1 also causes GlialCAM mislocalization in astrocytes by unknown mechanisms, leading to GlialCAM and CIC-2 mislocalization in oligodendrocytes due to the lack of trans-interactions.

(Capdevila-Nortes et al., 2015). It is not yet clear what parts of CIC-2 interact with GlialCAM; such information may help to shed light on the mechanistic details of the common gating process (Zuniga et al., 2004). However, recordings of CIC-2 currents in Bergmann glia in slices from wild type, *GlialCAM* and *Mlc1* KO mice (Hoegg-Beiler et al., 2014) or primary rat or mouse wild-type astrocytes in culture (Sirisi et al., 2017a) (which express *GlialCAM* and *MLC1*) do not show any modifications to currents. In astrocytes in culture, it was shown that *GlialCAM* did not interact with CIC-2 (Sirisi et al., 2017a). Here, the situation changed following incubation with a depolarizing solution for a short time. In this condition, CIC-2 forms a ternary complex with *GlialCAM* and *MLC1*, as revealed by immunofluorescence, co-immunoprecipitation, proximity ligation assays and patch-clamp measurements (Sirisi et al., 2017a). Furthermore, the localization of CIC-2 at junctions in primary astrocytes following incubation with a depolarizing solution was blocked when *Mlc1* was absent or *GlialCAM* was depleted by RNAi (Sirisi et al., 2017a). We have recently conducted similar experiments in primary astrocytes derived from *GlialCAM* KO mice and have obtained similar results (data not shown). Patch clamp experiments in depolarizing conditions have not been performed in Bergmann glia. However, since these cells show long, straight processes, recording the CIC-2 activity during these processes could be hindered by an access resistance problem, and the recording of the CIC-2 activity of these cells in slices may reflect only the CIC-2 present in the soma (Hoegg-Beiler et al., 2014). Nevertheless, based on results from recordings in primary astrocytes and oligodendrocytes in slices, we

suggest that the chloride influx at positive voltages mediated by *GlialCAM/MLC1/CIC-2* in astrocytes and *GlialCAM/CIC-2* in oligodendrocytes may be needed to compensate for an excess of potassium (Kofuji and Newman, 2004). In addition, with all these evidences, we propose that *GlialCAM/MLC1/CIC-2* in astrocytes may also interact in trans with *GlialCAM/CIC-2* in oligodendrocytes through *GlialCAM*, which would explain why an astrocytic *MLC1* knockout causes *GlialCAM* and *CIC-2* mislocalization in oligodendrocytes (Hoegg-Beiler et al., 2014) (Fig. 4).

5. Effect of MLC mutations on *GlialCAM* and *MLC1*

Several mutations have been identified in *MLC1* (Fig. 1A; for a detailed table, see the recent review (van der Knaap et al., 2012)). These mutations have been studied after the expression of *MLC1* alone in different systems such as *Xenopus* oocytes (Montagna et al., 2006; Teijido et al., 2004; Lopez-Hernandez et al., 2011b; Duarri et al., 2008), HeLa cells (Teijido et al., 2004; Lopez-Hernandez et al., 2011b; Duarri et al., 2008), human astrocytoma cells (Xie et al., 2012; Lanciotti et al., 2012, 2016) and primary astrocyte cultures (Lopez-Hernandez et al., 2011b; Capdevila-Nortes et al., 2013; Duarri et al., 2008), and endogenously in monocytes from *MLC1* patients (Duarri et al., 2008; Petrini et al., 2013) and in a brain biopsy from an *MLC1* patient containing an *MLC1* mutation (Lopez-Hernandez et al., 2011b). In general, most of the mutations studied attenuated the cell surface expression of *MLC1*. As occurs with many other diseases caused by mutations that affect membrane proteins, such as cystic fibrosis, the experiments involving expression in heterologous systems revealed differences that depended on the cell system and possibly on the expression levels of each mutant and the performance of the quality control machinery (in the endoplasmic reticulum and the plasma membrane) (Drumm et al., 1991; Sharma et al., 2004). These differences included mutation P92S, which showed normal levels at the plasma membrane in *Xenopus* oocytes, but a dramatic reduction in transfected HeLa cells (Duarri et al., 2008). These experiments suggested that this mutation is temperature sensitive, as oocytes are incubated at lower temperatures than HeLa cells. Another example is mutation S246R, which presents a lower surface expression in primary astrocytes than HeLa cells and *Xenopus* oocytes. By contrast, the few studies that address the endogenous *MLC1* protein (as monocytes from *MLC1* patients containing the S246R mutation) showed a complete absence of *MLC1* protein (Duarri et al., 2008). We would therefore suggest that most mutations in *MLC1* may cause *MLC1* misfolding, which affects protein degradation and trafficking. No correlation can be established between the phenotype of patients and their genotype based on biochemical studies of these mutations, as we speculate that *MLC1* protein levels would be reduced in all cases. Co-expression with *GlialCAM* stabilized the *MLC1* mutants, and even corrected its localization at cell–cell junctions, thus demonstrating that *GlialCAM* is an obligatory subunit of *MLC1* that protects it from ER-associated degradation (Capdevila-Nortes et al., 2013).

In contrast to *MLC1* mutations, most *GLIALCAM* missense mutations do not affect *GlialCAM* protein expression, with the exception of mutation L23H, which affects the signal peptide of *GlialCAM* (Fig. 2B) (Lopez-Hernandez et al., 2011a, 2011b). Most of the mutations, which are found in *MLC2A* or *MLC2B* patients, affect the localization of *GlialCAM* at cell–cell junctions and, as a consequence, also affect the trafficking of *MLC1* and *CIC-2* to cell–cell junctions (Lopez-Hernandez et al., 2011a, 2011b; Arnedo et al., 2013; Arnedo et al., 2014). None of the mutants studied presented a reduction in the interaction with *MLC1* or *CIC-2* or a lack of *CIC-2* functional activation (Arnedo et al., 2014). Mutants that affect trafficking can be classified into two groups: some show defective homo-oligomerization and others show normal homo-oligomerization (Arnedo et al., 2014). We assume that this means that only those with normal homo-oligomerization have defective trans interaction, although there is a lack of evidence for this. Mutations found in *MLC2B* patients also act as dominant mutations in trafficking assays

(Lopez-Hernandez et al., 2011a). However, it remains unclear why *GLIALCAM* mutations are dominant or recessive. Two striking examples are mutation R92Q (recessive) and mutation R92W (dominant) (Fig. 2B). A knockin mouse with a dominant mutation found in MLC2B patients (G10S) has been generated and studied (Hoegg-Beiler et al., 2014). It shows partially defective trafficking of GlialCAM, MLC1 and ClC-2 to cell–cell junctions (Hoegg-Beiler et al., 2014). In view of the fact that MLC1 and GlialCAM expression in humans is higher in the early years of life (Bugiani et al., 2017; Dubey et al., 2015), the phenotypic reversibility of MLC2B in patients (van der Knaap et al., 2010) could be explained by the fact that they still have enough GlialCAM/MLC1 proteins to perform their functions in the latter stages of life. In contrast, the protein levels in the early years of life are not high enough for this active myelination process. According to this hypothesis, it should be possible to improve MLC patients' phenotype by introducing some GlialCAM/MLC1, even in adults. However, recent results have shown that overexpression of MLC1 in mice could have severe consequences and lead to cavitation (Sugio et al., 2017). Thus, expression levels of MLC1 should be controlled to avoid toxic effects.

A few GlialCAM mutations, however, do not present trafficking defects. One mutation (P148S) is defective only when expressed in *Mlc1* knockout astrocytes (Arnedo et al., 2014). We suggest that, in much the same way as GlialCAM stabilizes MLC1, MLC1 may also stabilize this mutant. Some other GlialCAM mutants, such as D211N, show a very interesting phenotype. They do not show any trafficking defects in any cell types, including *Mlc1*-deficient astrocytes (Arnedo et al., 2014). As discussed above, GlialCAM is internalized in the presence of a depolarizing solution when MLC1 is absent (Lopez-Hernandez et al., 2011b). In contrast, these mutants are never internalized, so they behave as gain-of-function mutations (Arnedo et al., 2014). However, in primary astrocytes, ClC-2 is translocated to cell–cell junctions in the presence of a depolarizing solution (Sirisi et al., 2017a), and the overexpression of these mutants blocks this translocation (Sirisi et al., 2017a). We speculate that this process of ClC-2 translocation after depolarization depends on the internalization of GlialCAM and subsequent recycling to the plasma membrane, which may be stabilized at the surface by MLC1. However, the mechanistic details of this process have yet to be studied in depth.

6. Other proteins regulated by GlialCAM/MLC1

Before the chloride channel ClC-2 was identified as a GlialCAM-interacting protein (Jeworutzki et al., 2012; Barrallo-Gimeno and Estévez, 2014), it was hypothesized that other chloride channels may be involved in MLC. In astrocytes, the activity of the volume-regulated anion channel (VRAC) is crucial for restoring astrocyte cell volume after a hypotonic shock in a process called regulatory volume decrease (RVD) (Hoffmann et al., 2009; Ernest et al., 2005). The channel releases chloride and other organic anions such as taurine, glutamate and even ATP (Lutter et al., 2017; Gaitán-Peñas et al., 2016; Voss et al., 2014; Qiu et al., 2014). Thus, it has been shown that, even in lymphoblast from patients that expresses undetectable levels of MLC1 protein by western blot, monocytes from patients, primary rat astrocytes with reduced expression of MLC1 and GlialCAM by RNAi and mouse astrocytes from *Mlc1* knockout (Dubey et al., 2015; Capdevila-Nortes et al., 2013; Petrini et al., 2013), that VRAC activity is reduced, but not completely abolished. Conversely, the overexpression of MLC1 enhances VRAC activity in primary astrocytes. At that time, we hypothesized that MLC1 may directly or indirectly influence the VRAC channel, but it could not be the channel itself, as the channel is expressed in all the cells in our body. The recent identification of LRRC8 heteromers (LRRC8A as the main subunit, plus different combinations of LRRC8B, C, D and E) as the molecular correlates of VRAC represents a new tool to shed light on how GlialCAM/MLC1 may influence this channel (Voss et al., 2014; Syeda et al., 2016; Hyzinski-García et al., 2014). Recent results in GlialCAM knockout mice (Bugiani et al., 2017) and unpublished

immunoaffinity purification results from our group suggest that these proteins do not interact directly (*manuscript in progress*). Thus, the regulation may be indirect.

Other proteins related to ionic homeostasis have been identified as putative MLC1-interacting proteins, including the Na,K-ATPase (Sugio et al., 2017; Brignone et al., 2011), the potassium channel Kir4.1 (Lanciotti et al., 2012), the calcium-permeable channel TRPV4 (Lanciotti et al., 2012), the water channel AQP4 (Lanciotti et al., 2012), connexin 43 (Wu et al., 2016) and the vacuolar ATPase (Brignone et al., 2014), the proton pump that regulates acidity. These proteins were identified by yeast two-hybrid (Y2H) or affinity purification methods such as pull-downs, co-fractionation and affinity purification using antibodies. However, there is no experimental evidence that these proteins interact directly with GlialCAM or MLC1 after they have been transfected in heterologous systems using standard biochemical methods. For the Na,K-ATPase there are contradictory results, since one group identified by Y2H MLC1 binding to the beta subunit (Brignone et al., 2011), whereas the other group identified binding to only the alpha subunit and excluded by immunoprecipitation that MLC1 interacted with the beta subunit (Sugio et al., 2017). Following this contradiction, the first group suggested that hypo-osmotic conditions increased MLC1 membrane expression and favoured MLC1/beta association (Brignone et al., 2011). In contrast, the other group indicated that MLC1 overexpression decreases the formation of heterodimers between the alpha and beta subunits compromising the activity of the ATPase (Sugio et al., 2017). In contrast, the activity and membrane expression was not altered in *Mlc1* KO astrocytes (Sugio et al., 2017). Furthermore, in all the cases studied its localization is not altered (as happens for instance with ClC-2) in *GlialCAM* and *Mlc1* knockout mice (Bugiani et al., 2017; Dubey et al., 2015).

In our opinion, it should first be verified that GlialCAM/MLC1 interacts directly with these proteins *in vitro* after expressing in cell lines and second, demonstrate that this interaction is lost in knockout or RNAi-depleted models to be completely sure that it is not a non-physiological indirect consequence of the over-expression. Only then would it be possible to interpret these changes as a direct consequence of GlialCAM/MLC1 function. On the other hand, due to compensatory mechanisms or biological differences (as it is with the timing of myelination between mice and humans (Dubey et al., 2015)), not always transgenic mouse models fully recapitulate pathological mechanisms. One then should validate this interaction in human-derived samples, as it has been done for instance in the interaction between GlialCAM and MLC1 (Lopez-Hernandez et al., 2011b). One clear example is the VRAC channel: VRAC has been shown to be regulated by multiple mechanisms (Mongin, 2015; Stauber, 2015; Jentsch et al., 2015; Pedersen et al., 2016) such as adhesion, GPCRs, phosphorylation and oxidation, processes that may also be regulated/influenced by MLC1 (Lanciotti et al., 2016). Even knockdown of AQP4 affects the VRAC channel (Benfenati et al., 2007). Possibly, MLC1 and also AQP4 do not interact directly with the VRAC channel but its deletion/over-expression may influence it by unknown mechanisms.

Other proteins that have been shown to be interactors of the GlialCAM/MLC1 complex are members of the dystrophin-glycoprotein complex (Ambrosini et al., 2008; Boor et al., 2007) like syntrophin, dystrobrevin and others such as caveolin (Lanciotti et al., 2010) and ZO-1 (Duarri et al., 2011). Their interactions have been demonstrated by means of affinity purification experiments using antibodies or pull-down experiments using intracellular regions of the MLC1 protein. We could consider these proteins as scaffolding proteins, which could regulate the targeting of GlialCAM/MLC1 (Bragg et al., 2006; Fanning and Anderson, 2009). In this case, one would not expect the localization of these proteins to change in *GlialCAM* or *Mlc1* knockout mice unless they interact directly. One example is the direct interaction between syntrophin and AQP4 (through a PDZ domain of syntrophin). In this case, as expected, syntrophin knockout affects the localization of AQP4 at the perivascular endfeet (Amiry-Moghaddam et al., 2003) but the

opposite is also true (Amiry-Moghaddam et al., 2003). In contrast, in AQP4 knockout there was a modest reduction in the localization of dystrophin and the localization of β -dystroglycan was unaltered (Amiry-Moghaddam et al., 2003). In MLC-related proteins, localization of MLC1 was unaltered in dystrophin KO, α -dystrobrevin KO and utrophin KO (Duarri et al., 2011). Importantly, Immunogold-EM showed that these proteins do not co-localize in human and rat tissue, since they are present in endothelial-astrocyte surfaces at the endfeet, whereas GlialCAM and MLC1 are present in astrocyte-astrocyte contacts (Duarri et al., 2011). Furthermore, the localization of syntrophin, α - and β -dystroglycan was not altered in *Mlc1* and *GlialCAM* knockout mice (Bugiani et al., 2017; Dubey et al., 2015). In contrast, the protein ZO-1 co-localize with MLC1 at astrocyte–astrocyte junctions by immunogold cytochemistry and also in cultured astrocytes (Duarri et al., 2011). The discovery that MLC1 co-purify with caveolin is interesting (Lanciotti et al., 2010; Moh et al., 2009b), since MLC1 contains a caveolin-binding-like motif (Fig. S1) and MLC1 expression have been detected in caveolar membrane rafts in astrocytes and rat/mouse brain (Lanciotti et al., 2010). However, in both cases, its localization was also unaltered in *GlialCAM* and *Mlc1* knockout mice (Bugiani et al., 2017; Dubey et al., 2015). More experiments are needed to unravel whether there is a direct interaction between these proteins or whether they are associated through an unknown bridge protein.

Recently, it has been shown that overexpression of MLC1, but not mutated MLC1, favours epidermal growth factor receptor (EGFR) degradation and inhibits EGF-induced Ca^{2+} entry, ERK1/2 and PLC γ 1 activation and calcium-activated KCa3.1 potassium channel function: all molecular pathways that are involved in the stimulation of astrocyte proliferation (Lanciotti et al., 2016). In fact, previous experiments by our group indicate that the expression of MLC1 is much higher in AraC-arrested astrocytes (Duarri et al., 2011). If these results are validated in knockout animals, they could be highly significant, since they suggest that MLC1 may also influence signal transduction processes, which could explain the heterogeneity of the effects observed after the overexpression or depletion of MLC1. Understanding the mechanisms of these processes is key to identifying therapeutic solutions for MLC patients.

7. A model of MLC pathogenesis

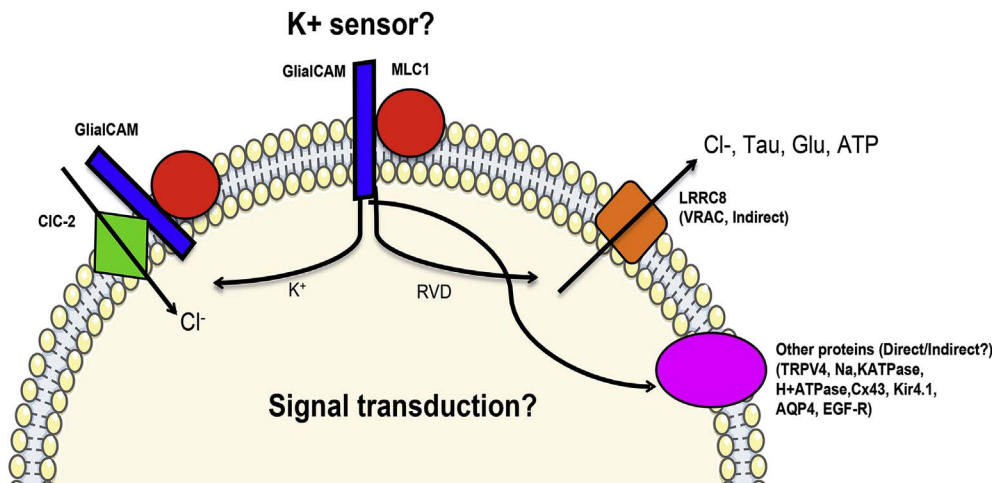
I began working on MLC in 2003, when I created my own group after working on a postdoctoral research project as part of a group led by Professor Thomas Jentsch, a very bright scientist who focuses primarily on chloride channels (Jentsch et al., 2002). In 2001, Marjo van der Knaap's group identified the first MLC gene (Leegwater et al., 2001). I had read that MLC was characterized by myelin vacuolization. Since chloride fluxes are usually linked to water movements, I thought that MLC could be due to a defect in new chloride channels, which was my recent area of expertise, so it seemed an interesting project to work on. Looking back, I can see that this naive hypothesis was correct. Furthermore, many surprises have emerged in research into the molecular mechanisms of the pathogenesis of this disease by different groups. The first surprise was that, although brain biopsies had indicated that vacuoles are mostly present in the outer layer of myelin (van der Knaap et al., 1996), MLC1 is expressed only at the cell contacts between astrocytes around the endfeet and in Bergmann glia (Hoegg-Beiler et al., 2014). It is not present in neurons, as initially indicated but later corrected by our group due to the lack of a control *Mlc1* knockout when the first experiments were performed (Teijido et al., 2004, 2007; Hoegg-Beiler et al., 2014). Moreover, initial confocal experiments suggested that it is expressed in ependymal cells, but this was revealed to be untrue by electron microscopy experiments with knockout animals as a control (Sirisi et al., 2014). How, then, do defects in an astrocytic protein cause vacuoles in myelin? The first studies to use RNAi in astrocytes and re-examination of a brain biopsy in MLC patients indicated that vacuoles are also present in astrocytes and show swelling (Duarri

et al., 2011). Studies with *Mlc1* and *GlialCAM* knockout mice showed that astrocytic swelling precedes myelin vacuolization and the degree of white matter vacuolization parallels the increased thickness of perivascular astrocyte processes, thus suggesting that astrocytic swelling leads to water retention in myelin (Bugiani et al., 2017; Dubey et al., 2015). On the other hand, as *GlialCAM* is mislocalized in oligodendrocytes in *Mlc1* knockout mice, CIC-2 activity is altered in oligodendrocytes, as shown in recordings from slices (Hoegg-Beiler et al., 2014). Therefore, both processes may occur simultaneously and oligodendrocytes are perhaps more sensitive to osmotic alterations. Future research on *GlialCAM* and/or CIC-2 cell-specific knockout mice is perhaps required to resolve this issue.

Another exciting finding was the discovery that the CIC-2 chloride channel is associated with *GlialCAM* (Jeworutzki et al., 2012), since this harked back to my past work in finding subunits of CLC channels (Estevez et al., 2001; Barrallo-Gimeno et al., 2015a). This was followed by our initial hypothesis that CIC-2 dysfunction could fully explain the pathogenesis of MLC (Maduke and Reimer, 2012). However, this rather naive idea was incorrect. Several findings contradict it: i) MLC1 has been shown to influence many other proteins and activities, such as the volume-regulated anion channels (Capdevila-Nortes et al., 2013). ii) Double knockout of *GlialCAM* and CIC-2 has a stronger vacuolation phenotype than the knockout of CIC-2 alone, thus suggesting that *GlialCAM* may affect other processes (Hoegg-Beiler et al., 2014). iii) Mutations in *CLCN2* have been identified in a different type of leukodystrophy (CC2L-related leukodystrophy) that manifests a phenotype that is different to the phenotype of MLC patients (Depienne et al., 2013; van der Knaap et al., 1993). It can therefore be suggested that CIC-2 dysfunction may contribute to MLC pathogenesis, but this is not the whole story.

The third exciting finding was recently reported by the group led by Elena Ambrosini, which indicated that *GlialCAM*/MLC1 might influence signal transduction cascades (Lanciotti et al., 2016). In light of the results of the changes observed in *GlialCAM* and CIC-2 after incubation with a depolarizing solution, a completely unproven model of MLC pathogenesis has now emerged. We speculated that MLC1 may be a potassium sensor (Sirisi et al., 2017b), or in another words, a neuronal activity sensor in astrocytes. If the homology of the potassium channel Kv1.1 is studied in depth (Fig. S2), the selectivity filter or residues involved in the pore are not conserved, unlike some features of the voltage sensor of the channel. We speculate that the localization of *GlialCAM*/MLC1 at astrocyte–astrocyte junctions or astrocyte–oligodendrocyte junctions could play a functional role in the process of sensing ions. It allows changes in the concentration of potassium, for instance, to be detected in advance, since small increases in the content of these ions in the tiny volume occupied by junctions increase their concentration dramatically. In view of Elena's results that MLC1 may affect different signal transduction processes, it may affect different proteins, such as astrocytic ion channels and transporters, via unknown mechanisms after detection of potassium concentration changes, which may help re-establish the homeostasis of ions and water (Fig. 5). As our colleague Professor Enrico Bertini suggested (Enrico's personal communication), MLC may be considered a metabolic disease that affects multiple processes, each of which helps regulate homeostasis. The fact that many processes are affected could explain the heterogeneity of phenotypes observed in MLC patients, even in siblings with the same mutation (Riel-Romero et al., 2005). On the other hand, *GlialCAM* and MLC1 may also play different roles such as acting as scaffolding for other proteins, as is the case with CIC-2. As shown for other membrane proteins, such as the chloride/proton antiporter CIC-7 (Barrallo-Gimeno et al., 2015b), several functions may co-exist in *GlialCAM*/MLC1, each with different levels of importance for the phenotype of MLC patients.

Thus, in terms of finding a treatment for MLC patients, we envisaged several strategies that can be established. A gene therapy approach using adeno-associated viruses may obviously be beneficial, as shown in



flux at positive voltages may be important to compensate positive potassium charges, which could be important in the process of potassium siphoning. In an indirect manner, GlialCAM/MLC1 may regulate the volume-regulated anion channel (VRAC), which is formed by LRRc8 proteins and that mediates efflux of chloride, osmolytes such as taurine and other molecules that act as neurotransmitters like glutamate or ATP. The activation of this channel is important in the process of regulatory volume decrease (RVD) that happens in astrocytes during hypotonic shock. Possibly, the activation of VRAC and other channels, transporters or receptors is mediated in a direct or indirect manner through signal transduction events that still have to be defined.

other brain disorders (Georgiou et al., 2017). Special care should be taken to control expression levels, since too much MLC1 could also be deleterious. Pharmacological chaperones that could restore MLC1 expression at the plasma membrane could also be used, in the same way as they have been tested in other diseases such as cystic fibrosis (Verkman and Galletta, 2009; Brown et al., 1996; Thomas et al., 1995). Finally, understanding the way in which GlialCAM/MLC1 influences signal transduction processes and identifying pharmacological methods to manipulate them could also represent a potential strategy for ameliorating the symptoms of MLC patients.

Acknowledgements

This work was supported in part by grants from the European Leukodystrophies Association (ELA) Research Foundation (ELA2012-014C2B) to RE and VN, Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF SAF2012-31486 to RE and SAF2015-70377 to RE and ABG), Generalitat de Catalunya ((SGR2014-1178) to RE), (SGR2014-541) to VN), Instituto de Salud Carlos III (bodies linked to MICINN and FEDER): (ERARE) to RE, FIS PI13/00121 to VN. RE is a recipient of an ICREA Academia prize. ABG is a Serra-Hunter fellow. We thank to all collaborators on the MLC studies.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmg.2017.10.013>.

References

- Ambrosini, E., Serafini, B., Lanciotti, A., et al., 2008. Biochemical characterization of MLC1 protein in astrocytes and its association with the dystrophin-glycoprotein complex. *Mol. Cell Neurosci.* 37, 480–493.
- Amiry-Moghaddam, M., Williamson, A., Palomba, M., et al., 2003. Delayed K⁺ clearance associated with aquaporin-4 mislocalization: phenotypic defects in brains of alpha-syntrophin-null mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 13615–13620.
- Arnedo, T., Aiello, C., Jeworutzki, E., et al., 2013. Expanding the spectrum of megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts in two patients with GLIALCAM mutations. *Neurogenetics*. <http://dx.doi.org/10.1007/s10048-013-0381-x>.
- Arnedo, T., López-Hernández, T., Jeworutzki, E., et al., 2014. Functional analyses of mutations in HEPACAM causing megalencephalic leukoencephalopathy. *Hum. Mutat.* 35, 1175–1178.
- Barrallo-Gimeno, A., Estévez, R., 2014. GlialCAM, a glial cell adhesion molecule implicated in neurological disease. *Adv. Neurobiol.* 8, 47–59.
- Barrallo-Gimeno, A., Gradogna, A., Zanardi, I., Pusch, M., Estévez, R., 2015a. Regulatory-

- auxiliary subunits of CLC chloride channel-transport proteins. *J. Physiol.* 593, 4111–4127.
- Barrallo-Gimeno, A., Gradogna, A., Zanardi, I., Pusch, M., Estévez, R., 2015b. Regulatory/Auxiliary subunits of CLC chloride channel/transport proteins. *J. Physiol.* <http://dx.doi.org/10.1113/JP270057>.
- Benfenati, V., Nicchia, G.P., Svelto, M., Rapisarda, C., Frigeri, A., Ferroni, S., 2007. Functional down-regulation of volume-regulated anion channels in AQP4 knockdown cultured rat cortical astrocytes. *J. Neurochem.* 100, 87–104.
- Bildl, W., Haupt, A., Müller, C.S., et al., 2012. Extending the dynamic range of label-free mass spectrometric quantification of affinity purifications. *Mol. Cell Proteomics* 11 M111.007955.
- Blanz, J., Schweizer, M., Auberson, M., et al., 2007. Leukoencephalopathy upon disruption of the chloride channel ClC-2. *J. Neurosci.* 27, 6581–6589.
- Blattner, R., Von Moers, A., Leegwater, P.A., Hanefeld, F.A., Van Der Knaap, M.S., Kohler, W., 2003. Clinical and genetic heterogeneity in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (MLC). *Neuropediatrics* 34, 215–218.
- Boor, P.K., de Groot, K., Waisfisz, Q., et al., 2005. MLC1: a novel protein in distal astroglial processes. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 64, 412–419.
- Boor, I., Nagtegaal, M., Kamphorst, W., et al., 2007. MLC1 is associated with the dystrophin-glycoprotein complex at astrocytic endfeet. *Acta Neuropathol.* 114, 403–410.
- Bragg, A.D., Amiry-Moghaddam, M., Ottersen, O.P., Adams, M.E., Froehner, S.C., 2006. Assembly of a perivascular astrocyte protein scaffold at the mammalian blood-brain barrier is dependent on alpha-syntrophin. *Glia* 53, 879–890.
- Brignone, M.S., Lanciotti, A., Macioce, P., et al., 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.
- Brignone, M.S., Lanciotti, A., Visentin, S., et al., 2014. Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts protein-1 modulates endosomal pH and protein trafficking in astrocytes: relevance to MLC disease pathogenesis. *Neurobiol. Dis.* 66, 1–18.
- Brignone, M.S., Lanciotti, A., Camerini, S., et al., 2015. MLC1 protein: a likely link between leukodystrophies and brain channelopathies. *Front. Cell Neurosci.* 9, 66.
- Brown, C.R., Hong-Brown, L.Q., Biwersi, J., Verkman, A.S., Welch, W.J., 1996. Chemical chaperones correct the mutant phenotype of the delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein. *Cell Stress Chaperones* 1, 117–125.
- Bugiani, M., Dubey, M., Breur, M., et al., 2017. Megalencephalic leukoencephalopathy with cysts: the *Glialcam*-null mouse model. *Ann. Clin. Neurol.* 4, 450–465.
- Capdevila-Nortes, X., Lopez-Hernandez, T., Ciruela, F., Estevez, R., 2012. A modification of the split-tobacco etch virus method for monitoring interactions between membrane proteins in mammalian cells. *Anal. Biochem.* 423, 109–118.
- Capdevila-Nortes, X., López-Hernández, T., Apaja, P.M., 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.
- Capdevila-Nortes, X., Jeworutzki, E., Elorza-Vidal, X., Barrallo-Gimeno, A., Pusch, M., Estévez, R., 2015. Structural determinants of interaction, trafficking and function in the CIC-2/MLC1 subunit GlialCAM involved in leukodystrophy. *J. Physiol.* 593, 4165–4180.
- Chung Moh, M., Hoon Lee, L., 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.
- 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.
- Drumm, M.L., Wilkinson, D.J., Smit, L.S., et al., 1991. Chloride conductance expressed by

- delta F508 and other mutant CFTRs in *Xenopus* oocytes. *Science* 254, 1797–1799.
- Duarri, A., Teijido, O., Lopez-Hernandez, T., et al., 2008. Molecular pathogenesis of megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: mutations in MLC1 cause folding defects. *Hum. Mol. Genet.* 17, 3728–3739.
- Duarri, A., Lopez de Heredia, M., Capdevila-Nortes, X., et al., 2011. Knockdown of MLC1 in primary astrocytes causes cell vacuolation: a MLC disease cell model. *Neurobiol. Dis.* 43, 228–238.
- Dubey, M., Bugiani, M., Ridder, M.C., et al., 2015. Mice with megalencephalic leukoencephalopathy with cysts: a developmental angle. *Ann. Neurol.* 77, 114–131.
- Ernest, N.J., Weaver, A.K., Van Duyn, L.B., Sontheimer, H.W., 2005. Relative contribution of chloride channels and transporters to regulatory volume decrease in human glioma cells. *Am. J. Physiol. Physiol.* 288, C1451–C1460.
- 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.
- Fanning, A.S., Anderson, J.M., 2009. Zonula occludens-1 and -2 are cytosolic scaffolds that regulate the assembly of cellular junctions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1165, 113–120.
- Favre-Kontula, L., Rolland, A., Bernasconi, L., et al., 2008. GlialCAM, an immunoglobulin-like cell adhesion molecule is expressed in glial cells of the central nervous system. *Glia* 56, 633–645.
- Fernández-Marmiesse, A., Gouveia, S., Couce, M.L., 2017. NGS technologies as a turning point in rare disease research, diagnosis, and treatment. *Curr. Med. Chem.* 24. <http://dx.doi.org/10.2174/0929867324666170718101946>.
- Gaitán-Peñas, H., Gradogna, A., Laparra-Cuervo, L., et al., 2016. Investigation of LRRC8-mediated volume-regulated anion currents in *Xenopus* oocytes. *Biophys. J.* 111, 1429–1443.
- Georgiou, E., Sidiropoulou, K., Richter, J., et al., 2017. Gene therapy targeting oligodendrocytes provides therapeutic benefit in a leukodystrophy model. *Brain* 140, aww351.
- Gurezka, R., Laage, R., Brosig, B., Langosch, D., 1999. A heptad motif of leucine residues found in membrane proteins can drive self-assembly of artificial transmembrane segments. *J. Biol. Chem.* 274, 9265–9270.
- Haj-Yasein, N.N., Jensen, V., Vindedal, G.F., et al., 2011. Evidence that compromised K⁺ spatial buffering contributes to the epileptogenic effect of mutations in the human kir4.1 gene (KCNJ10). *Glia* 59, 1635–1642.
- Hoegg-Beiler, M.B., Sirisi, S., Orozco, I.J., et al., 2014. Disrupting MLC1 and GlialCAM and ClC-2 interactions in leukodystrophy entails glial chloride channel dysfunction. *Nat. Commun.* 5, 3475.
- Hoffmann, E.K., Lambert, I.H., Pedersen, S.F., 2009. Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiol. Rev.* 89, 193–277.
- Hyzinski-García, M.C., Rudkouskaya, A., Mongin, A.A., 2014. LRRC8A protein is indispensable for swelling-activated and ATP-induced release of excitatory amino acids in rat astrocytes. *J. Physiol.* 592, 4855–4862.
- Ilja Boor, P.K., de Groot, K., Mejaski-Bosnjak, V., et al., 2006. Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: an update and extended mutation analysis of MLC1. *Hum. Mutat.* 27, 505–512.
- Jentsch, T.J., Stein, V., Weinreich, F., Zdebik, A.A., 2002. Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol. Rev.* 82, 503–568.
- Jentsch, T.J., Lutter, D., Planells-Cases, R., Ullrich, F., Voss, F.K., 2015. VRAC: molecular identification as LRRC8 heteromers with differential functions. *Pflügers Arch.* <http://dx.doi.org/10.1007/s00424-015-1766-5>.
- Jeworutzki, E., Lopez-Hernandez, T., Capdevila-Nortes, X., et al., 2012. GlialCAM, a protein defective in a leukodystrophy, serves as a ClC-2 Cl⁻ channel auxiliary subunit. *Neuron* 73, 951–961.
- Jeworutzki, E., Lagostena, L., Elorza-Vidal, X., López-Hernández, T., Estévez, R., Pusch, M., 2014. GlialCAM, a ClC-2 Cl⁻ channel subunit, activates the slow gate of ClC chloride channels. *Biophys. J.* 107, 1105–1116.
- Kariminejad, A., Rajaei, A., Ashrafi, M.R., et al., 2015. Eight novel mutations in MLC1 from 18 Iranian patients with megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Eur. J. Med. Genet.* 58, 71–74.
- Kaye, E.M., 2001. Update on genetic disorders affecting white matter. *Pediatr. Neurol.* 24, 11–24.
- van der Knaap, M.S., Bugiani, M., 2017. Leukodystrophies: a proposed classification system based on pathological changes and pathogenetic mechanisms. *Acta Neuropathol.* <http://dx.doi.org/10.1007/s00401-017-1739-1>.
- van der Knaap, M.S., Valk, J., de Neeling, N., Nauta, J.J., 1991. Pattern recognition in magnetic resonance imaging of white matter disorders in children and young adults. *Neuroradiology* 33, 478–493.
- van der Knaap, M.S., Depienne, C., Sedel, F., Abbink, T.E., 1993. CLCN2-Related Leukoencephalopathy. University of Washington, Seattle. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26539602>, Accessed date: 29 April 2017.
- van der Knaap, M.S., Barth, P.G., Stroink, H., et al., 1995a. Leukoencephalopathy with swelling and a discrepantly mild clinical course in eight children. *Ann. Neurol.* 37, 324–334.
- van der Knaap, M.S., Valk, J., Barth, P.G., Smit, L.M., van Engelen, B.G., Tortori Donati, P., 1995b. Leukoencephalopathy with swelling in children and adolescents: MRI patterns and differential diagnosis. *Neuroradiology* 37, 679–686.
- van der Knaap, M.S., Barth, P.G., Vrensen, G.F., Valk, J., 1996. Histopathology of an infantile-onset spongiform leukoencephalopathy with a discrepantly mild clinical course. *Acta Neuropathol.* 92, 206–212.
- van der Knaap, M.S., Lai, V., Kohler, W., et al., 2010. Megalencephalic leukoencephalopathy with cysts without MLC1 defect. *Ann. Neurol.* 67, 834–837.
- van der Knaap, M.S., Boor, I., 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.
- Kofuji, P., Newman, E.A., 2004. Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience* 129, 1045–1056.
- Lanciotti, A., Brignone, M.S., Camerini, S., et al., 2010. MLC1 trafficking and membrane expression in astrocytes: role of caveolin-1 and phosphorylation. *Neurobiol. Dis.* 37, 581–595.
- Lanciotti, A., Brignone, M.S., Molinari, P., 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.
- Lanciotti, A., Brignone, M.S., Visentin, S., et al., 2016. Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts protein-1 regulates epidermal growth factor receptor signaling in astrocytes. *Hum. Mol. Genet.* 25, 1543–1558.
- Leegwater, P.A., Yuan, B.Q., van der Steen, J., 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.
- Leegwater, P.A., Boor, P.K., Yuan, B.Q., et al., 2002. Identification of novel mutations in MLC1 responsible for megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Hum. Genet.* 110, 279–283.
- Lopez-Hernandez, T., Ridder, M.C., Montolio, M., 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.
- Lopez-Hernandez, T., Sirisi, S., Capdevila-Nortes, X., et al., 2011b. Molecular mechanisms of MLC1 and GLIALCAM mutations in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Hum. Mol. Genet.* 20, 3266–3277.
- Lutter, D., Ullrich, F., Lueck, J.C., Kempa, S., Jentsch, T.J., 2017. Selective transport of neurotransmitters and -modulators by distinct volume-regulated LRRC8 anion channels. *J. Cell Sci.* 130, jcs.196253.
- Maduke, M.C., Reimer, R.J., 2012. Biochemistry to the rescue: a ClC-2 auxiliary subunit provides a tangible link to leukodystrophy. *Neuron* 73, 855–857.
- Moh, M.C., Tian, Q., Zhang, T., Lee, L.H., Shen, S., 2009a. The immunoglobulin-like cell adhesion molecule hepaCAM modulates cell adhesion and motility through direct interaction with the actin cytoskeleton. *J. Cell Physiol.* 219, 382–391.
- Moh, M.C., Lee, L.H., Zhang, T., Shen, S., 2009b. Interaction of the immunoglobulin-like cell adhesion molecule hepaCAM with caveolin-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 378, 755–760.
- Mongin, A.A., 2015. Volume-regulated anion channel—a frenemy within the brain. *Pflügers Arch.* <http://dx.doi.org/10.1007/s00424-015-1765-6>.
- Montagna, G., Teijido, O., Eymard-Pierre, E., et al., 2006. Vacuolating megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: functional studies of novel variants in MLC1. *Hum. Mutat.* 27, 292.
- Muller, C.S., Haupt, A., Bildl, W., et al., 2010. Quantitative proteomics of the Cav2 channel nano-environments in the mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 14950–14957.
- Nobile, M., Pusch, M., Rapisarda, C., Ferroni, S., 2000. Single-channel analysis of a ClC-2-like chloride conductance in cultured rat cortical astrocytes. *FEBS Lett.* 479, 10–14.
- Nomura, N., Miyajima, N., Sazuka, T., et al., 1994. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. I. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0001–KIAA0040) deduced by analysis of randomly sampled cDNA clones from human immature myeloid cell line KG-1. *DNA Res.* 1, 27–35.
- Park, E., Campbell, E.B., MacKinnon, R., 2016. Structure of a ClC chloride ion channel by cryo-electron microscopy. *Nature* 541, 500–505.
- Pascual-Castroviejo, I., van der Knaap, M.S., Pronk, J.C., Garcia-Segura, J.M., Gutierrez-Molina, M., Pascual-Pascual, S.I., 2005. Vacuolating megalencephalic leukoencephalopathy: 24 year follow-up of two siblings. *Neurologia* 20, 33–40.
- Patrono, C., Di Giacinto, G., Eymard-Pierre, E., et al., 2003. Genetic heterogeneity of megalencephalic leukoencephalopathy and subcortical cysts. *Neurology* 61, 534–537.
- Pedersen, S.F., Okada, Y., Nilius, B., 2016. Biophysics and physiology of the volume-regulated Anion Channel (VRAC)/Volume-Sensitive outwardly rectifying Anion Channel (VSOR). *Pflügers Arch.* <http://dx.doi.org/10.1007/s00424-015-1781-6>.
- Petrini, S., Minnone, G., Cocchetti, M., et al., 2013. Monocytes and macrophages as biomarkers for the diagnosis of megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Mol. Cell Neurosci.* 56C, 307–321.
- Qiu, Z., Dubin, A.E., Mathur, J., et al., 2014. SWELL1, a plasma membrane protein, is an essential component of volume-regulated anion channel. *Cell* 157, 447–458.
- Ratte, S., Prescott, S.A., 2011. ClC-2 channels regulate neuronal excitability, not intracellular chloride levels. *J. Neurosci.* 31, 15838–15843.
- Riel-Romero, R.M., Smith, C.D., Pettigrew, A.L., 2005. Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts in two siblings owing to two novel mutations: case reports and review of the literature. *J. Child. Neurol.* 20, 230–234.
- Scheper, G.C., van Berkel, C.G., Leisle, L., et al., 2010. Analysis of CLCN2 as candidate gene for megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Genet. Test. Mol. Biomarkers* 14, 255–257.
- Schiffmann, R., van der Knaap, M.S., 2004. The latest on leukodystrophies. *Curr. Opin. Neurol.* 17, 187–192.
- Sharma, M., Pampinella, F., Nemes, C., et al., 2004. Misfolding diverts CFTR from recycling to degradation: quality control at early endosomes. *J. Cell Biol.* 164, 923–933.
- Sik, A., Smith, R.L., Freund, T.F., 2000. Distribution of chloride channel-2-immunoreactive neuronal and astrocytic processes in the hippocampus. *Neuroscience* 101, 51–65.
- Singhal, B.S., Gursahani, R.D., Udani, V.P., Biniwale, A.A., 1996. Megalencephalic leukodystrophy in an Asian Indian ethnic group. *Pediatr. Neurol.* 14, 291–296.
- Sirisi, S., Folgueira, M., López-Hernández, T., 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., et al., 2017a. 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.
- Sirisi, S.S., Elorza-Vidal, X., Arnedo, T., et al., 2017b. 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.
- Stauber, T., 2015. The volume-regulated anion channel is formed by LRRC8 heteromers – molecular identification and roles in membrane transport and physiology. *Biol. Chem.* 396, 975–990.
- Sugio, S., Tohyama, K., Oku, S., et al., 2017. Astrocyte-mediated infantile-onset leukoencephalopathy mouse model. *Glia* 65, 150–168.
- Syeda, R., Qiu, Z., Dubin, A.E., et al., 2016. LRRC8 proteins form volume-regulated anion channels that sense ionic strength. *Cell* 164, 499–511.
- Tejjido, O., Martinez, A., Pusch, M., et al., 2004. Localization and functional analyses of the MLC1 protein involved in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Hum. Mol. Genet.* 13, 2581–2594.
- Tejjido, O., Casaroli-Marano, R., Kharkovets, T., et al., 2007. Expression patterns of MLC1 protein in the central and peripheral nervous systems. *Neurobiol. Dis.* 26, 532–545.
- Thomas, P.J., Qu, B.H., Pedersen, P.L., 1995. Defective protein folding as a basis of human disease. *Trends Biochem. Sci.* 20, 456–459.
- Topcu, M., Gartioux, C., Ribierre, F., et al., 2000. Vacuolizing megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts, mapped to chromosome 22qtel. *Am. J. Hum. Genet.* 66, 733–739.
- Verkman, A.S., Galletta, L.J., 2009. Chloride channels as drug targets. *Nat. Rev. Discov.* 8, 153–171.
- Voss, F.K., Ullrich, F., Münch, J., et al., 2014. Identification of LRRC8 heteromers as an essential component of the volume-regulated Anion Channel VRAC. *Science*. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1252826>.
- Wang, J., Shang, J., Wu, Y., et al., 2011. Identification of novel MLC1 mutations in Chinese patients with megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (MLC). *J. Hum. Genet.* 56, 138–142.
- Wu, M., Moh, M.C., Schwarz, H., 2016. HepaCAM associates with connexin 43 and enhances its localization in cellular junctions. *Sci. Rep.* 6, 36218.
- Xie, H., Wang, J., Dhaunchak, A.S., et al., 2012. Functional studies of MLC1 mutations in Chinese patients with megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *PLoS One* 7, e33087.
- Yang, T., Espenshade, P.J., Wright, M.E., et al., 2002. Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell* 110, 489–500.
- Yuzbasioglu, A., Topcu, M., Cetin Kocaepe, Y., Ozguc, M., 2011. Novel mutations of the MLC1 gene in Turkish patients. *Eur. J. Med. Genet.* 54, 281–283.
- Zolles, G., Wenzel, D., Bildl, W., et al., 2009. Association with the auxiliary subunit PEX5R/Trip8b controls responsiveness of HCN channels to cAMP and adrenergic stimulation. *Neuron* 62, 814–825.
- Zuniga, L., Niemeyer, M.I., Varela, D., Catalan, M., Cid, L.P., Sepulveda, F.V., 2004. The voltage-dependent ClC-2 chloride channel has a dual gating mechanism. *J. Physiol.* 555, 671–682.